



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΠΟΥΛΙΑΝΙΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2017

**ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ: ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ECHO ΙΩΝ**

**GENOMICS OF ENTEROVIRUSES: SEARCH FOR
RECOMBINATIONS BETWEEN CIRCULATING
STRAINS OF ECHO VIRUSES**

ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ: ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΕΧΟΙΩΝ

ΠΟΥΛΙΑΝΙΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

**Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων - Μοριακής Βακτηριολογίας -
Ιολογίας**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

Π.ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δ.ΚΟΜΙΩΤΗΣ

Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στην σύνθεση βιοδραστικών μορίων

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δ.ΜΟΣΙΑΛΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

« Ένα ταξίδι χιλίων χιλιομέτρων ξεκινάει με ένα πρώτο βήμα».

Αρχαία κινεζική παροιμία.

Όταν ξεκίνησα την φοίτησή μου στο πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας-Γενετικής-Διαγνωστικοί δείκτες», ως αγροτικός Ιατρός τότε, δεν μπορούσα να φανταστώ πόσο χρήσιμες θα ήταν οι γνώσεις που απέκτησα. Οι γνώσεις αυτές με βοήθησαν πολύ κατά την άσκησή μου στην ειδικότητα της Παθολογικής Ανατομικής, για την κατανόηση των πολύπλοκων βιολογικών φαινομένων της νεοπλασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη ΔΕΠ του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας για την αμέριστη υπομονή και βοήθειά τους. Ιδιαίτερα τον καθηγητή κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο για την ανάθεση της πτυχιακής εργασίας και την πολύτιμη βοήθειά του στην εκπόνηση αυτής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την γραμματέα του προγράμματος μεταπτυχιακών Σπουδών κα. Αναστασία Βουλγάρα για την αδιάληπτη επικοινωνία που είχαμε όλο αυτόν τον καιρό και το ειλικρινές ενδιαφέρον που έδειξε. Τέλος ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην διδάκτορα κα. Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου, χωρίς την βοήθεια και την καθοδήγηση της οποίας, η πτυχιακή αυτή εργασία δεν θα είχε πραγματοποιηθεί ποτέ.

Αφιερωμένη στην μητέρα μου....

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος των εντεροϊών ανήκει στην μεγάλη οικογένεια των Picornaviridae. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει μικρούς RNA ιούς θετικής πολικότητας. Οι εντεροϊοί με την σειρά τους αποτελούνται από καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας χωρίς έλυτρο, το οποίο περικλείει ένα μόριο RNA μήκους περίπου 7500 νουκλεοτιδίων. Το γονιδίωμα τους έχει απλή κατασκευή και αποτελείται από ένα ολιγοπεπτίδιο (Vpg) συνδεδεμένο ομοιοπολικά με την 5'αμετάφραστη περιοχή (5'UTR), ακολουθούμενη από ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), και την 3' αμετάφραστη περιοχή (3'UTR) και ολοκληρώνεται με μία πολυαδενυλική ουρά. Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης κωδικοποιεί μία πολυπρωτεΐνη, η οποία διασπάται αυτοκαταλυτικά στις 4 δομικές (VP1-VP4) και τις 7 λειτουργικές (2A-2C, 3A-3D) πρωτεΐνες του ιού. Οι εντεροϊοί μεταδίδονται κυρίως σε συνθήκες χαμηλής κοινωνικο-οικονομικής κατάστασης και η κύρια οδός μετάδοσης είναι η κοπρανοστοματική. Είναι υπεύθυνοι για μία μεγάλη ποικιλία ασθενειών και κλινικών συνδρόμων, με πιο γνωστή την παραλυτική πολιομυελίτιδα, η οποία είναι γνωστή από την αρχαιότητα και η σχεδόν παγκόσμια εξάλειψή της αποτελεί ένα από τα πιο επιτυχημένα παραδείγματα εφαρμογής προγράμματος εμβολιασμού στην ιστορία της Ιατρικής.

Ο ανασυνδυασμός έχει αναγνωριστεί ως ο κύριος μηχανισμός εξέλιξης των εντεροϊών, με τα περισσότερα γεγονότα ανασυνδυασμού να αφορούν την μη καψιδιακή περιοχή. Για την μελέτη του ανασυνδυασμού στην περιοχή από την 5'UTR έως την VP1 καψιδιακή πρωτεΐνη, χρησιμοποιήσαμε το στέλεχος Gior, το οποίο απομονώθηκε από δείγμα κοπράνων κατά την διάρκεια επιδημίας στην Ελλάδα το 2001 και ανήκει στον ορότυπο Echovirus 30 (E-30). Το στέλεχος αλληλουχήθηκε και η νουκλεοτιδική αλληλουχία συγκρίθηκε με όλες τις λοιπές E-30 αλληλουχίες. Η σύγκριση των φυλογενετικών δέντρων με βάση την 5'UTR και την VP1 καψιδιακή πρωτεΐνη έδειξε ανακολουθίες όσον αφορά τα στελέχη, τις ομάδες και τις υποομάδες. Αναλυτικότερα η σύγκριση 62 αλληλουχιών ανέδειξε 6 φαινόμενα ανασυνδυασμού τα οποία εντοπίζονται όλα στην περιοχή 5'UTR-VP1, με εξαίρεση το στέλεχος Gior στο οποίο το ανασυνδυασμένο γενετικό υλικό εντοπίζεται αποκλειστικά εντός της 5'UTR. Η μελέτη του φαινομένου του ανασυνδυασμού στο κομμάτι αυτό του γενετικού υλικού θα μας βοηθήσει στην μελέτη της εξέλιξης των Echo ιών γενικά και ενδεχομένως πως επηρεάζεται η παθογένειά των στελεχών αυτών από το φαινόμενο του ανασυνδυασμού

Abstract

The genus of enteroviruses belongs to the broad family of Picornaviridae. This family consists of small positive strand RNA viruses. Enteroviruses consist of a naked capsid of icosahedral symmetry, which envelopes one molecule of RNA which is 7500 nucleotides in length. Their genome is simple and consists of an oligopeptide (VPg) covalently attached to a 5' untranslated region (5'UTR), followed by a single open reading frame and a 3' untranslated region (3'UTR) and finally a poly-A tale. The open reading frame codes for a single polyprotein which is then auto cleaved in 4 structural (VP1-VP4) and 7 nonstructural viral proteins. Enteroviruses are prevalent mainly in low socio-economic conditions and the mean route of transmission is the fecal-oral route. They are responsible for a great variety of deceases and clinical syndromes like paralytic poliomyelitis. Paralytic poliomyelitis is known since ancient years. The almost complete eradication of poliomyelitis worldwide, is one of the most successful examples of implementation of vaccination programs in the history of modern medicine.

Recombination is recognized as the mean mechanism of evolution among enteroviruses and is mainly seen in the capsid region of the genome. The strain Gior belongs to the serotype Echovirus-30 (E-30), and it was isolated from stool samples during an outbreak of meningitis epidemic in Greece during 2001. The strain was sequenced in its whole and it was compared to all available E-30 sequences. Then we constructed the phylogenetic trees based on the 5'UTR and VP1 genomic regions. The comparison of those trees revealed differences in the lineages and sub-lineages. Those differences were investigated with Similarity Plot analysis, using 62 available sequences from the GenBank that covered the genomic region 5'UTR, VP4 and VP2. Our investigation exposed 6 recombination events that enclosed the genomic region 5'UTR-VP4. These results showed that this particular region can be a hot spot for recombination events in circulating enteroviruses. The consequences of such events in the pathogeny of enteroviruses is yet to be understood.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΜΕΡΟΣ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

ΓΕΝΙΚΑ

1. Ιστορικά στοιχεία.....	9
2. Ταξινόμηση.....	10

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.

ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

1. Καψίδιο.....	12
2. Γονιδίωμα των εντεροϊών-Γενική δομή.....	14
3. Η 5' αμετάφραστη περιοχή (5'UTR).....	14
4. Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF).....	16
5. Η 3' αμετάφραστη περιοχή (3'UTR).....	17

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

1. Υποδοχείς.....	18
2. Κύκλος ζωής.....	19

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

1. Επιδημιολογία.....	23
2. Παθογένεια και ανοσία.....	24

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

1.Εισαγωγικά.....	27
2.Μεταλλάξεις.....	27
3.Ανασυνδυασμός.....	28
4.Μηχανισμοί Ανασυνδυασμού.....	29

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

1.Περιβαλλοντικά δείγματα.....	30
2.Κλινικά δείγματα.....	31
ΣΚΟΠΟΣ.....	33

ΜΕΡΟΣ II

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.Περιγραφή των ιικών στελεχών.....	34
2.Εκχύλιση του ιικού RNA.....	34
3.Μόρια εκκινητές.....	35
4.Αντίστροφη μεταγραφή (RT).....	36
5.Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	37
6.Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR.....	38
7.Καθαρισμός και αλληλούχηση των προϊόντων της PCR.....	38
8.Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.....	39

ΜΕΡΟΣ III

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.Φυλογενετικό δέντρο με βάση την αλληλουχία της VP1.....	42
2.Φυλογενετικό δέντρο με βάση την αλληλουχία της 5' UTR.....	45
3.Ανίχνευση ανασυνδυασμών.....	47
4.Ανάλυση των ανασυνδυασμένων στελεχών.....	54
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	58
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ιστορικά στοιχεία

Το γένος των εντεροϊών ανήκει στην οικογένεια των Picornaviridae και περιλαμβάνει μία πληθώρα ιών οι οποίοι προκαλούν ασθένειες σε θηλαστικά και στον άνθρωπο. Η πιο γνωστή από τις ασθένειες αυτές είναι η πολιομυελίτιδα, η οποία οφείλεται σε ένα από τα τρία είδη των πολιοϊών.

Η πολιομυελίτιδα είναι γνωστή εδώ και χιλιάδες χρόνια με απεικονίσεις της ασθένειας στην αρχαία τέχνη. Η παλαιότερη γνωστή καταγραφή της μας έρχεται από τον μεγάλο πολιτισμό της αρχαίας Αιγύπτου και συγκεκριμένα από μία επιτύμβια στήλη, που χρονολογείται από το 1400 π.Χ στην οποία μπορεί κανείς να διακρίνει έναν ιερέα το όνομα του οποίου είναι Siptah και την οικογένειά του, και ο οποίος απεικονίζεται με το ένα κάτω άκρο παραλυμένο και αδυνατισμένο, κλασικό κλινικό σημείο της παραλυτικής πολιομυελίτιδας. Η ασθένεια αυτή γνωστή και ως παιδική παράλυση αναγνωρίστηκε ως ξεχωριστή κλινική οντότητα από τον Άγγλο παθολόγο και χειρουργό Michael Underwood (1736-1820) το 1789. Ο αιτιολογικός παράγοντας, ο ιός της πολιομυελίτιδας ή πολιοϊός (Poliovirus) απομονώθηκε από τους Karl Landsteiner και Erwin Popper το 1909. Το 1981 το πλήρες γονιδίωμα (γένωμα) του ιού δημοσιεύτηκε από δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες. Ο πολιοϊός είναι ένας από τους πιο καλά χαρακτηρισμένους ιούς και έχει γίνει χρήσιμο μοντέλο για την κατανόηση της βιολογίας των RNA ιών. Τα εμβόλια ενάντια στην πολιομυελίτιδα είναι δύο ειδών. Το πρώτο, το οποίο είναι ενέσιμο (IPV), παράγεται από αδρανοποιημένους ιούς. Το δεύτερο περιλαμβάνει εξασθενημένους ιούς και λαμβάνεται από το στόμα (OPV). Το πρώτο εμβόλιο που παρασκευάστηκε ήταν το ενέσιμο από τον John Salk το 1955 και φέρει το όνομά του. Το OPV παρασκευάστηκε από τον Albert Sabin (και επίσης φέρει το όνομά του) και κυκλοφόρησε το 1961. Και τα δύο εμβόλια συνέβαλαν σχεδόν στην εξάλειψη της νόσου της πολιομυελίτιδας από 350.000 κρούσματα το 1988 σε 37 το 2016 (Poliomyelitis, WHO 2016).

Ο πρώτος Cocksackie A ιός (CAV) απομονώθηκε το 1948 από τον Dr Gilbert Dalldorf, ερευνητή του υπουργείου υγείας της Πολιτείας της Νέας Υόρκης. Ο ιός αυτός

απομονώθηκε από τα κόπρανα ασθενών με πολιομυελίτιδα, και πήρε το όνομά του από την κωμόπολη Cocksackie, στις όχθες του ποταμού Hudson της Νέας Υόρκης από όπου ο Dalldorf απομόνωσε τα πρώτα του δείγματα. Στην συνέχεια απομονώθηκαν και άλλοι ιοί και ταξινομήθηκαν αρχικά σε δύο ομάδες ανάλογα με την παθογένειά τους σε νεογέννητα ποντίκια. Οι ιοί Cocksackie A προκαλούν παράλυση και θάνατο στα πειραματόζωα με εκτεταμένη μυοσκελετική νέκρωση, ενώ αυτοί της ομάδας B προκαλούν λιγότερο σοβαρές βλάβες ,αλλά προσβάλλουν περισσότερα όργανα όπως καρδιά, εγκέφαλο, συκώτι, πάγκρεας κτλ. Οι πρώτοι ECHO ιοί, το όνομα των οποίων προήλθε από τα αρχικά των λέξεων Enteric Cytopathic Human Orphan, επειδή δεν είχαν ακόμα συσχετισθεί με καμιά γνωστή ασθένεια, απομονώθηκαν από τα κόπρανα ασυπτωματικών ασθενών το 1981.

2. Ταξινόμηση

Το γένος των εντεροϊών (enteroviruses) ανήκει στην μεγάλη οικογένεια των Picorna ιών (Picornaviridae), η οποία με την σειρά της ανήκει στην κατηγορία IV ,σύμφωνα με την ταξινόμηση των ιών κατά Baltimore. Τα μέλη μιας ορισμένης οικογένειας ιών έχουν συγκεκριμένη μορφολογία ιοσώματος, δομή γονιδιώματος και αντιγραφική μέθοδο. Η ονομασία της οικογένειας Picornaviridae προέρχεται από το πρόθεμα pico-, το οποίο σημαίνει πολύ μικρό, και το ακρωνύμιο RNA, επειδή οι ιοί της οικογένειας αυτής έχουν ως γενετικό υλικό ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας , δηλαδή ένα μόριο το οποίο κατά σύμβαση έχει την ίδια πολικότητα με το αγγελιοφόρο RNA (mRNA). Η οικογένεια των Picorna ιών αποτελεί πραγματικά μία τεράστια οικογένεια, η οποία σύμφωνα με την τελευταία ταξινόμηση της Διεθνούς Επιτροπής για την Ταξινόμηση των ιών (International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV) αποτελείται από 35 γένη!

Το γένος των εντεροϊών (όπως βέβαια συμβαίνει και σε κάθε γένος ιών γενικά) αποτελείται από αντιγονικά διακριτά στελέχη, δηλαδή στελέχη τα οποία προκαλούν εκ μέρους των οργανισμών στόχων την παραγωγή ειδικού αντισώματος και ονομάζονται ορότυποι. Αρχικά οι ορολογικά διακριτοί ιοί είχαν ταξινομηθεί σε 4 είδη με βάση τις διαφορετικές κυτταρικές αλλοιώσεις σε καλλιέργειες και την διαφορετική παθογένειά τους σε πειραματικά μολυσμένα ζώα. Τα είδη αυτά ήταν αρχικά τα εξής:

- 1) Πολιοϊοί (PV, ορότυποι 1-3), οι αιτιολογικοί παράγοντες της πολιομυελίτιδας στους ανθρώπους και σε άλλα πρωτεύοντα
- 2) Ιοί Cocksackie A (CAV, ορότυποι 1-24), σχετιζόμενοι με αφθώδη στοματίτιδα-κυνάγχη, καθώς και παθήσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και χαλαρή παράλυση σε ποντίκια
- 3) Ιοί Cocksackie B (CBV, ορότυποι 1-6), σχετιζόμενοι με παθήσεις του ΚΝΣ και καρδιολογικές παθήσεις καθώς και σπαστική παράλυση σε ποντίκια

- 4) Ιοί Echo (E, ορότυποι 1-33) , μη παθογόνοι για τα ποντίκια και αρχικά τον άνθρωπο.

(Knipe and Howely,2007, Lugo and Krogstad,2016)

Με την πρόοδο όμως της μοριακής βιολογίας πραγματοποιήθηκε μία πραγματική έκρηξη στην ανακάλυψη νέων ειδών εντεροϊών. Ταυτόχρονα με την διαπίστωση ότι οι μοριακές τεχνικές υπερέρχουν της οροταυτοποίησης, η ταξινόμηση του γένους των εντεροϊών έχει εξελιχθεί ώστε να περιλαμβάνει σήμερα 13 είδη. Τα είδη αυτά είναι τα εξής: Enteroviruses A-J και οι ρινοϊοί Rhinoviruses A-C. Από αυτά τα επτά προσβάλλουν το ανθρώπινο είδος και ταξινομούνται στα 4 πρώτα είδη των εντεροϊών (Enterovirus, EV A-D) καθώς και στα 3 είδη των ρινοϊών.

Πλέον στους εντεροϊούς αποδίδεται ένας σειριακός αριθμός και ταξινομούνται ανάλογα με την φαινοτυπική και την γενετική τους ομοιότητα. Μέχρι σήμερα πάνω από 110 είδη γενετικά διακριτών εντεροϊών οι οποίοι προσβάλλουν τον άνθρωπο και άλλα πρωτεύοντα ταξινομούνται σε 4 είδη εντεροϊών όπως είπαμε (EV A-D). Στον πίνακα 1 που ακολουθεί μπορούμε να δούμε την ταξινόμηση των εντεροϊών σύμφωνα με την Διεθνή Επιτροπή για την ταξινόμηση των ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, 10th report).

Enterovirus A,24 Πρώην Human enterovirus A	Coxsackievirus (CV)-A2 – CK-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14,CV-A16 Enterovirus(EV)-A71, EV-A76, EV-A89 - EV92, EV-A114, EV-A119-120, SV19, SV43,SV46,BA13
Enterovirus B, 61 Πρώην Human enterovirus B	Coxsackievirus (CV)-B1-6, CV-A9, Echovirus(E)-1-9, E11-E21, E-24 - E-27, E-29 - E-33 Enterovirus(EV) -B69, EV-B73 – EV-B75, EV-B77 – EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EVB-101, EV-B106, EV-B107, EV-B110, EV-B111, SA5
Enterovirus C, 23 Πρώην Human enterovirus C	Poliovirus(PV)1- PV3 Coxsackievirus(CV)-A1, CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22, CV-A24, Enterovirus(EV)-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116, EV-C117, EV-C118
Enterovirus D, 5 Πρώην Human enterovirus D	Enterovirus(EV)-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111, EV-D120
Enterovirus E, 4 Πρώην Bovine enterovirus group A	Enterovirus(EV)-E1 – EV-E4
Enterovirus F, 6 Πρώην Bovine enterovirus group B	Enterovirus(EV)-F1 – EV-F6

Enterovirus G, 11 Πρώην Porcine enterovirus group B	Enterovirus(EV)-G1 – EV-G11
Enterovirus H, 1 Πρώην Simian enterovirus group A	Enterovirus(EV)-H1
Enterovirus j, 6	Simian virus 6 (SV6) Enterovirus(EV)-J103, EV-J108, EV-J115, EV-J121
Rhinovirus A,80 Πρώην Human rhinovirus A	Human rhinovirus(RV) A1, A2, A7-A16, A18-A25, A28-A34, A36, A38-A41, A43-A47, A49, A50, A53-A68, A78, A80-A82, A85, A88-A90, A71, A73-A77, A94, A96, A98, A100-A109
Rhinovirus B,32 Πρώην Human rhinovirus B	Human rhinovirus (RV)-B3-B6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B48, B52, B69, B70, B72, B79, B83, B84, B86, B91-B93, B97, B99, B100-B106
Rhinovirus C,53 Πρώην Human rhinovirus C	Human rhinovirus (RV) C1-C53a

Πίνακας-1: Ταξινόμηση του γένους των εντεροϊών στα διάφορα είδη (International Committee on Taxonomy of Viruses, 10th report)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:

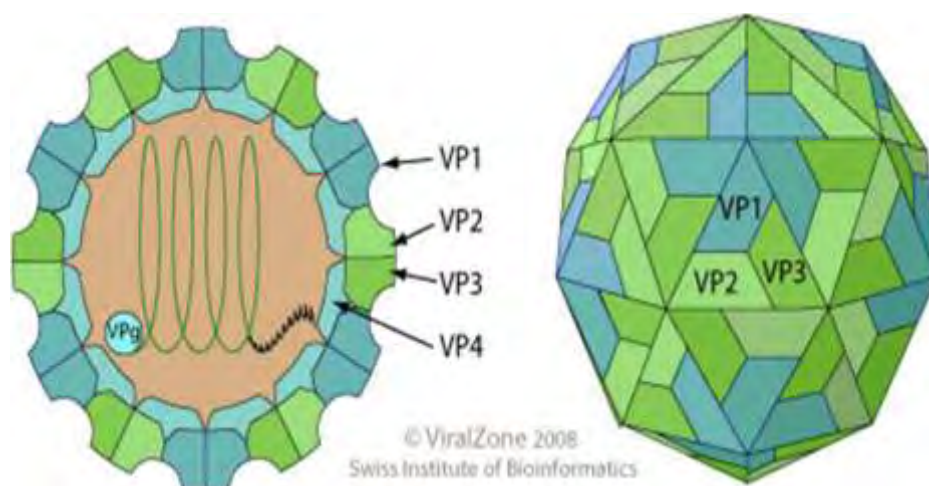
Δομή των εντεροϊών.

1. Καψίδιο.

Οι εντεροϊοί όπως αναφέραμε προηγουμένως δεν περιβάλλονται από λιπιδικό έλυτρο, πρόκειται δηλαδή για γυμνούς ιούς. Με τη χρήση αναλύσεων της περίθλασης ηλεκτρονίων από κρυστάλλους ιών βρέθηκε ότι τα καψίδια (ιοσώματα) των εντεροϊών έχουν σφαιρικό σχήμα και η διάμετρός τους κυμαίνεται περίπου στα 30nm. Η συμμετρία του καψιδίου είναι εικοσαεδρική και αποτελείται από την γεωμετρικά καθορισμένη επανάληψη των βασικών δομικών μονάδων που λέγονται πρωτομερή. Συγκεκριμένα κάθε πρωτομέρες αποτελείται από 4 δομικές πρωτεΐνες οι οποίες ονομάζονται VP1, VP2, VP3, VP4 (οι πρωτεΐνες VP2 και VP4 στην αρχική φάση, την φάση του προκαψιδίου όπως ονομάζεται, είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες σε ένα σύμπλοκο, VP0) (Rossman et al.,1989). Πέντε πρωτομερή ενώνονται για να σχηματίσουν ένα πενταμέρες. Στη συνέχεια δώδεκα πενταμερή συνδυάζονται και σχηματίζουν μια πρόδρομη δομή που ονομάζεται προκαψίδιο. Το καψίδιο επομένως των εντεροϊών αποτελείται από 60 αντίγραφα κάθε μίας από τις 4 καψιδιακές πρωτεΐνες . Το τελικό στάδιο του σχηματισμού του καψιδίου είναι η διάσπαση της VP0 στις πρόδρομες πρωτεΐνες (VP2 και VP4). Το τελικό αυτό στάδιο ωρίμανσης πραγματοποιείται κατά την φάση της καψιδίωσης, κατά την φάση δηλαδή που το ιικό RNA παίρνει την θέση του στα καψίδια. Στο ώριμο πλέον

καψίδιο, οι πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 διατάσσονται στο εξωτερικό, ενώ η VP4, η οποία είναι και η μικρότερη, εντοπίζεται στο εσωτερικό (Racaniello et al., 2007). Το ώριμο ιικό σωματίο των εντεροϊών είναι πολύ σταθερό και χαρακτηρίζεται από υψηλή ανθεκτικότητα σε όξινο pH, αλλά και σε απορρυπαντικά και διάφορα πρωτεολυτικά ένζυμα (Pfister et al., 1999)

Η εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου φέρει διάφορες προεξοχές και αυλακώσεις. Από αυτές πιο σημαντική είναι μία στενή αλλά βαθιά αυλάκωση, η οποία μοιάζει με φαράγγι (canyon) και σχηματίζεται ανάμεσα στις δομικές πρωτεΐνες VP1 και VP3. Η αυλάκωση αυτή βρίσκεται σε σταθερή απόσταση από τον άξονα πενταπλούς συμμετρίας. Το σχήμα της συγκεκριμένης αυλάκωσης φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του ιού. Αναλυτικότερα το πλάτος της είναι σχετικά στενό έτσι ώστε τα σχετικά μεγάλα μόρια των αντισωμάτων να μην μπορούν να εισέλθουν εύκολα στο εσωτερικό της και από την άλλη μεριά στο εσωτερικό της υπάρχουν περιοχές που μπορούν να συνδεθούν με κυτταρικούς υποδοχείς και με τον τρόπο αυτό να γίνει η προσκόλληση του ιοσώματος στο κύτταρο υποδοχέα και η είσοδος του μέσα σε αυτό (Stanway G, 1990). Οι περιοχές αυτές του πρωτεϊνικού περιβλήματος των ιών που βρίσκονται μέσα στο «φαράγγι» είναι φυλογενετικά σταθερές διότι όπως αντιλαμβανόμαστε παίζουν μεγάλη σημασία στον βιολογικό κύκλο ζωής των ιών. Αντίθετα τμήματα του καψιδίου τα οποία δεν έχουν τόσο μεγάλη βιολογική σημασία συσσωρεύουν μεταλλάξεις, με συνέπεια να παρουσιάζουν ποικιλομορφία ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων τους και συνεπώς ως προς την τριτοταγή δομή τους και κατά επαγωγή επηρεάζεται η συνάφειά τους με τα διάφορα εξουδετερωτικά αντισώματα. Με τον τρόπο αυτό, αν και οι περιοχές αυτές λειτουργούν ως επίτοποι, γιατί μπορούν να αναγνωριστούν από τα αντισώματα, λόγω της μεταβλητότητάς τους μπορούν να ξεφεύγουν από την ανοσολογική επιτήρηση. Στην εικόνα που ακολουθεί απεικονίζεται σχηματικά το καψίδιο των εντεροϊών και η κατανομή των διαφόρων πρωτεϊνών στα μονομερή.

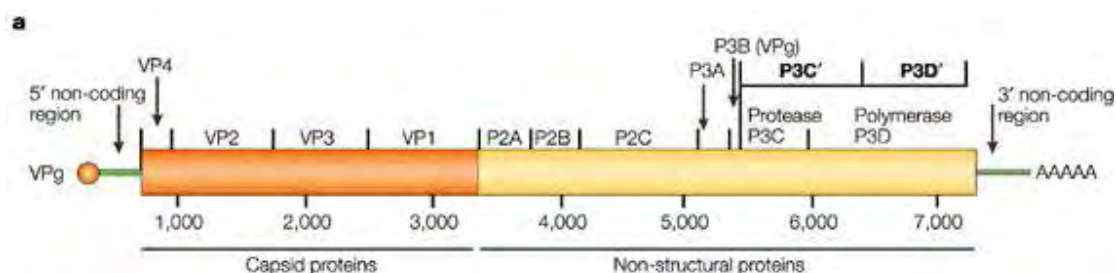


Εικόνα-1: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του καψιδίου των εντεροϊών (Swiss Institute of Bioinformatics)

2. Γονιδίωμα των εντεροϊών-Γενική δομή.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας, το οποίο έχει μήκος 7500 νουκλεοτιδίων (Melnick J.L, 1990). Το μόριο αυτό, ξεκινώντας από το 5' άκρο του, αποτελείται από τα ακόλουθα διακριτά τμήματα:

- 1) Μία μικρή πρωτεΐνη, η οποία καλείται Vpg, η οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το πρώτο νουκλεοτίδιο της
- 2) 5' αμετάφραστης περιοχής (5' untranslated region, UTR),
- 3) ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF), και ακολουθεί η
- 4) 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR), η οποία καταλήγει
- 5) σε μία πολυαδενιλική ουρά [poly(A)-tract].



Εικόνα-2: σχηματική αναπαράσταση του γονιδιώματος των εντεροϊών.

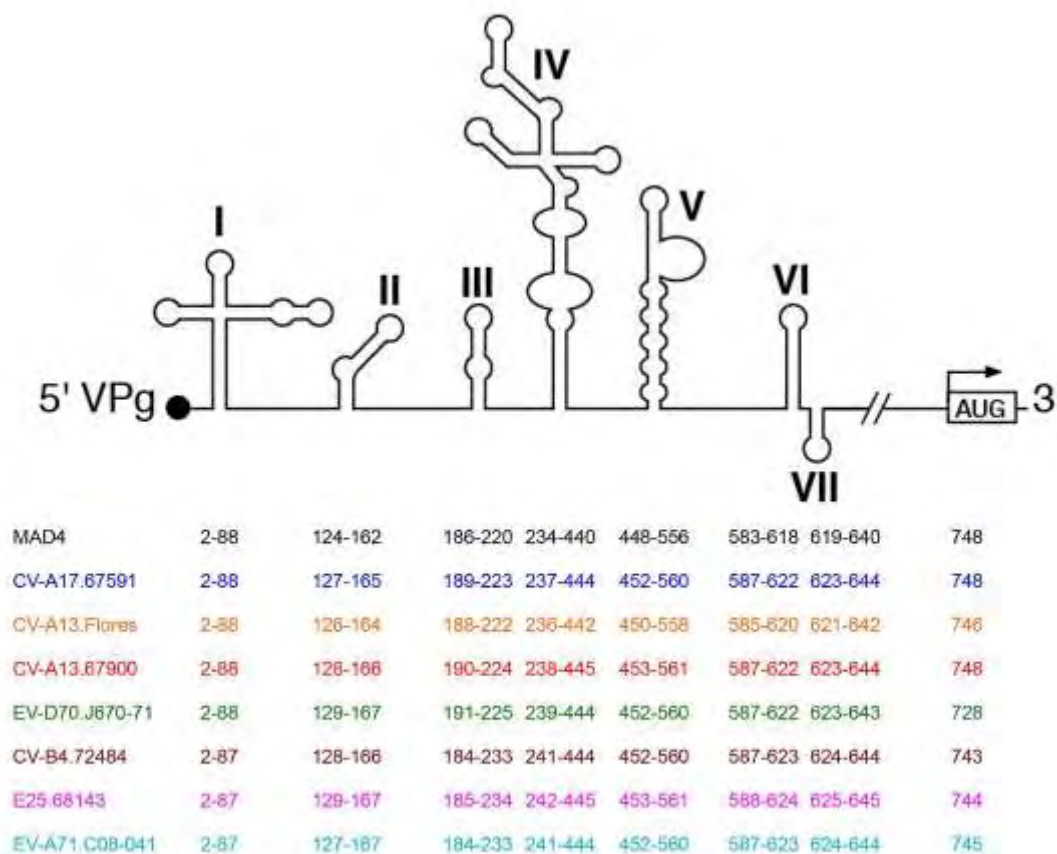
(<https://emergingviralpathogens.wordpress.com>)

3. Η 5' αμετάφραστη περιοχή (5'-UTR).

Η 5' UTR έχει μήκος περίπου 730-750 νουκλεοτιδίων και είναι αρκετά μεγάλη σε σχέση με αντίστοιχες περιοχές άλλων ιών ή ακόμα και κυττάρων. Περιλαμβάνει περίπου το 10% του συνόλου των νουκλεοτιδίων. Μάλιστα φυλογενετικές έρευνες έχουν δείξει ότι είναι αρκετά συντηρημένη μεταξύ συγγενικών ιών (Stanway et al., 1984) και αυτό γιατί έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στον εγκλεισμό του ιικού RNA στο πρωτεϊνικό περίβλημα και τον πολλαπλασιασμό του ιού και κατά συνέπεια στον κύκλο ζωής του (Kauder and Racaniello, 2004).

Το γεγονός ότι η περιοχή αυτή είναι αρκετά συντηρημένη έχει αξιοποιηθεί για την σύνθεση εκκινητών (primers) οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση διαφόρων εντεροϊών (Siafakas et al., 2000). Ένα ακόμα χαρακτηριστικό είναι η παρουσία νουκλεοτιδίων γουανίνης και κυτοσίνης σε μεγάλη αναλογία στο γονιδίωμα. Όπως γνωρίζουμε, μεταξύ των καταλοίπων της γουανίνης και της κυτοσίνης σχηματίζονται 3 δεσμοί υδρογόνου με αποτέλεσμα τα μόρια RNA τα οποία περιέχουν τις βάσεις αυτές σε μεγάλη αναλογία να έχουν πολλές δευτεροταγείς δομές.

Πράγματι η 5'-UTR των εντεροϊών περιλαμβάνει επτά περιοχές δευτεροταγών δομών που σχηματίζουν διακριτά τμήματα (domains), τα οποία αριθμούνται με λατινικούς χαρακτήρες από I-VII. Στο σχήμα-3, φαίνεται σχηματικά η 5'αμετάφραστη περιοχή με τα τμήματά της και το μήκος αυτών για κάποιους αντιπροσωπευτικούς εντεροϊούς.



Εικόνα-3: Σχηματική αναπαράσταση της 5'UTR των εντεροϊών.(Claire et al., 2015)

Τα πρώτα 88 περίπου νουκλεοτίδια σχηματίζουν μια δομή που μοιάζει με τριφύλλι (cloverleaf) και η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην σταθεροποίηση του μορίου πριν την αρχή της μεταγραφής (Melchers et al., 2006). Τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται

στις θέσεις 122-636 περίπου και σχηματίζουν τις δευτεροταγείς δομές II-VI και σχηματίζουν το εσωτερικό σημείο εισόδου του ριβοσώματος (Internal Ribosome Entry Site-IRES). Μάλιστα ο πολιοϊός ήταν ο πρώτος ιός στον οποίο περιγράφηκε το στοιχείο IRES (Pelletier and Sonenberg,1988). Τα ριβοσώματα και οι κυτταρικοί παράγοντες που αποτελούν την μεταφραστική μηχανή του κυττάρου, αρχικά προσδένονται στο IRES και στην συνέχεια μετακινούνται (ολισθαίνουν) μέχρι το κωδικόνιο έναρξης, έτσι ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της μετάφρασης. Το κωδικόνιο έναρξης βρίσκεται στο τέλος της 5'UTR, στο τελευταίο τμήμα VII, σε απόσταση 150 περίπου νουκλεοτιδίων από το IRES. Η περιοχή αυτή μεταξύ του IRES και του κωδικονίου έναρξης είναι και η λιγότερο συντηρημένη Wimmer et al.,1993)

4.Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)

Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame-ORF) κωδικοποιεί μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια διασπάται αυτοκαταλυτικά στις δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης των εντεροϊών αποτελείται από τρία τμήματα που καλούνται P1, P2 και P3.

Η P1 περιοχή του γονιδιώματος κωδικοποιεί τις καψιδιακές πρωτεΐνες (VP1-VP4) και αποτελεί στόχο μοριακών τεχνικών, γιατί μπορεί αξιόπιστα να συσχετισθεί με τον ορότυπο του ιού (Oberste et al.,1999). Οι λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού κωδικοποιούνται από τα τμήματα P2 και P3 του ιού. Οι λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού είναι επτά (2A-2C και 3B-3D) και κωδικοποιούνται από τα τμήματα P2 και P3 αντίστοιχα. Εκτός όμως από τις τελικές αυτές πρωτεΐνες, ουσιαστικό και ρυθμιστικό ρόλο έχουν και κάποια ενδιάμεσα τους και πιο συγκεκριμένα τα ενδιάμεσα 2BC, 3AB και 3CD).

Οι λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού καθώς και τα ενδιάμεσα τους και ο ρόλος τους περιληπτικά είναι οι εξής:

- 1) Πρωτεάση 2A: πρωτεάση κυστεΐνης η οποία είναι υπεύθυνη για την διάσπαση της αρχικής πολυπρωτεΐνης μεταξύ των περιοχών P1 και P2, διαχωρίζοντας έτσι τις δομικές από τις λοιπές πρωτεΐνες (Toyoda et al.,1986).
- 2) Πρωτεΐνη 2B: έχει δράση πολυμεράσης, συμμετέχει στην ιική αντιγραφή (Cuconati et al.,1998) και αυξάνει την διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών (Barco et al.,1995)
- 3) Πρωτεΐνη 2C: έχει δράση ελίκασης, αλλά και δραστικότητα GTPασης και ATPασης (Psister et al.,1999). Συμμετέχει στο σύμπλοκο της αντιγραφής του ιικού RNA (Bienz et al.,1990)

- 4) Πρωτεΐνη 2BC: αποτελεί πρόδρομη πρωτεΐνη των 2B και 2C. Ανιχνεύεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου των κυττάρων ξενιστών και προκαλεί αναδιάταξη αυτών και δημιουργία κυστιδίων μέσα στο κυτταρόπλασμα, τα οποία θα αποτελέσουν τις θέσεις της αντιγραφής.
- 5) Πρωτεΐνη 3A: έχει επίσης την ικανότητα να προσδένεται σε μεμβράνες και συμμετέχει επίσης στον σχηματισμό των κυστιδίων αντιγραφής (Belon et al., 2007). Συμμετέχει επίσης στην σύνθεση του θετικής πολικότητας RNA και την επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης.
- 6) Πρωτεΐνη 3B ή VPg: πρόκειται για ένα μικρό πεπτίδιο μήκους 22 αμινοξέων ομοιοπολικά συνδεδεμένο με την υδροξυλική ομάδα ενός υπολείμματος αδενυλικού οξέος στο 5' άκρο του γονιδιώματος και παίζει ρόλο εκκινητικού μορίου κατά την ιική αντιγραφή, αλλά συμμετέχει επίσης στον σχηματισμό του καψιδίου (Paul et al., 1998)
- 7) Πρωτεΐνη 3C: πρωτεάση κυστεΐνης, η οποία παίζει ρόλο στην πρωτεολυτική διάσπαση της αρχικής ιικής πολυπρωτεΐνης (Marcotte et al., 2007). Επίσης μπορεί να αναστείλει την κυτταρική πρωτεϊνοσύνθεση και να προάγει την ιική μετάφραση (Clark and Dasgupta, 1990 και Back et al., 2002).
- 8) Πρωτεΐνη 3D ή 3D^{pol} : αποτελεί την ιική πολυμεράση. Πρόκειται για μια RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Το καταλυτικό της κέντρο είναι συντηρημένο σε όλους τους Picorna ιούς και έχει ομοιότητες με το καταλυτικό κέντρο άλλων RNA ιών, αλλά και με το καταλυτικό κέντρο της αντίστροφης μεταγραφάσης των ρετροϊών (Kamer and Argos, 1984) . Η 3D πολυμεράση συνθέτει νέα μόρια RNA χρησιμοποιώντας σαν εκκινητικό μόριο την VPg πρωτεΐνη. Έχει την ικανότητα παραγωγής τόσο θετικής όσο και αρνητικής πολικότητας RNA, έχει δράση ελίκασης και καταλύει την προσθήκη της πολυαδενυλικής ουράς στο 3' άκρο του θετικής πολικότητας RNA (Pfister et al., 1999).
- 9) Πρωτεΐνη 3AB: αποτελεί μέλος του συμπλόκου αντιγραφής. Σταθεροποιεί το πεπτίδιο VPg στις κυτταρικές μεμβράνες για την έναρξη της αντιγραφής, αυξάνει την δραστικότητα της 3Dpol (Richards et al., 1998) και την ενεργότητα της 3CD πρωτεάσης (Molla et al., 1994). Τέλος έχει βρεθεί ότι λειτουργεί σαν μόριο συνοδός (chaperon), βοηθώντας το ιικό RNA να λάβει την ευνοϊκότερη θερμοδυναμική διαμόρφωση για την έναρξη της αντιγραφής.
- 10) Πρωτεΐνη 3CD: έχει δραστικότητα πρωτεάσης (Marcotte et al., 2007) , αλλά και αποτελεί μέλος του συμπλόκου αντιγραφής (Belon et al., 2007). Έχει την ικανότητα να εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και αυτοδιασπάται στις πρωτεΐνες 3C και 3D (Weidmann et al., 2003).

5. Η 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR)

Η 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) εμφανίζει ποικιλότητα τόσο στο μήκος των νουκλεοτιδίων όσο και στην αλληλουχία των αμινοξέων μεταξύ των διαφορετικών μελών του γένους των εντεροϊών της οικογένειας των Picorna ιών. Παρά την ποικιλομορφία της, η 3'-UTR φέρει και συντηρημένες περιοχές, οι οποίες σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές. Στο τέλος της βρίσκεται μία πολυαδενυλική ουρά. Η τελευταία αυτή περιοχή του γονιδιώματος των εντεροϊών φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην αντιγραφή του αρνητικού κλώνου, όσο και στη μετάφραση των ιικών πρωτεϊνών μέσω αλληλεπίδρασης με το στοιχείο IRES (Herold and Andino, 2001).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

1.Υποδοχείς

Οι εντεροϊοί (όπως και όλοι γενικά οι ιοί) είναι γενετικά στοιχεία τα οποία χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς των κυττάρων ξενιστών τους για την αναπαραγωγή τους. Για να γίνει αυτό φυσικά απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η είσοδος του ιοσώματος (δηλαδή της ώριμης-μολυσματικής εξωκυτταρικής μορφής του ιού) στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω σύνδεσης πρωτεϊνών του καψιδίου με μακρομόρια της κυτταρικής μεμβράνης που μπορεί να είναι πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια, πολυσακχαρίτες κτλ. και τα οποία δρουν ως υποδοχείς του ιού.

Κάθε ιός χρησιμοποιεί συνήθως έναν συγκεκριμένο υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή. Κάποιες φορές όμως η σύνδεση με έναν υποδοχέα δεν επαρκεί και απαιτείται η συμμετοχή ενός δεύτερου βοηθητικού μορίου που καλείται συνυποδοχέας.

Οι ιοί της οικογένειας των εντεροϊών χρησιμοποιούν μια πληθώρα κυτταρικών υποδοχέων για την είσοδό τους στα κύτταρα. Η σύνδεση του ιού στους υποδοχείς και συνυποδοχείς του οδηγούν στην αλλαγή της στερεοδιάταξης του καψιδίου έτσι ώστε να μπορέσει να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα (Rossman et al., 1994). Πολλοί από αυτούς τους υποδοχείς εμφανίζουν δομή παρόμοια με τη δομή των ανοσοσφαιρινών. Τέτοιοι υποδοχείς (Ig-like) είναι: 1) ο ICAM-1 (Intracellular

Adhesion Molecule-1) ο οποίος συνδέεται με Coxsackie A ιούς, 2) ο υποδοχέας των πολιοϊών (Poliovirus Receptor, PVR) και 3) ο υποδοχέας CAR (Coxsackie Adenovirus Receptor). Άλλοι υποδοχείς έχουν δομή πρωτεϊνών ρύθμισης του συμπληρώματος (SCR-like), όπως είναι ο μεμβρανικός κυτταρικός υποδοχέας CD55 ή DAF (Decay-Accelerating Factor). Οι περισσότεροι υποδοχείς συνδέονται με συντηρημένες αλληλουχίες αμινοξέων των καψιδιακών πρωτεϊνών VP1 και VP3, οι οποίες όπως έχουμε αναφέρει στο κεφάλαιο της δομής του καψιδίου συμμετέχουν στον σχηματισμό της χαρακτηριστικής εξωτερικής βαθιάς αύλακας-φαράγγι. Στον πίνακα 2 που ακολουθεί φαίνονται οι κυριότεροι γνωστοί υποδοχείς και συνυποδοχείς των εντεροϊών.

Ιός	Υποδοχέας	Τύπος υποδοχέα	Συνυποδοχέας
Πολιοϊοί 1-3	PVR	Ig-like	
Coxsackie A13, A18, A21	Icam-1	Ig-like	
Enterovirus 70	CD55	SCR-like	
Coxsackie A21	CD55	SCR-like	Icam-1
Coxsackie B1, B3, B5	CD55	SCR-like	A
Echo 3, 6, 7, 11-13, 20, 21, 24, 29, 33	CD55	SCR-like	β_2 -microglobulin
Echo 1, 8		Integrin	β_2 -microglobulin
Coxsackie B1-B6	CAR	Ig-like	

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: κυτταρικοί υποδοχείς και συνυποδοχείς των εντεροϊών.
(Κυριακοπούλου Ζ.,2010)

2. Κύκλος ζωής

Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1) Πρόσδεση του ώριμου καψιδίου στον υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή και είσοδος στο κυτταρόπλασμα με ενδοκύττωση.
- 2) Αποδιάταξη του καψιδίου και απελευθέρωση του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα.
- 3) Το γονιδίωμα του ιού, το οποίο όπως έχουμε αναφέρει είναι θετικής πολικότητας RNA, λειτουργεί ως αγγελιοφόρο RNA και μεταφράζεται με την «χρήση» της αντιγραφικής μηχανής του κυττάρου ξενιστή. Προϊόν αυτής της μετάφρασης είναι όπως προαναφέρθηκε μία πολυπρωτεΐνη, η οποία αυτοδιασπάται στις δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού.
- 4) Το ιικό RNA δρα ως μήτρα για την σύνθεση του αρνητικού κλώνου του RNA. Στην συνέχεια οι αρνητικοί κλώνοι δρουν ως μήτρες για την σύνθεση νέων θετικής πολικότητας μορίων. Η διαδικασία της αντιγραφής λαμβάνει χώρα

σε μεμβρανικά κυστίδια, τα οποία «στρατολογούνται» από ιικές πρωτεΐνες, όπως θα δούμε παρακάτω.

- 5) Συναρμολόγηση του ιικού καψιδίου ως προκαψίδιο, διάσπαση της διμερούς πρωτεΐνης VP0 στις πρωτεΐνες VP2 και VP4 και σχηματισμός του ώριμου καψιδίου.
- 6) Απελευθέρωση των ιοσωμάτων στο περιβάλλον με εξωκυττάρωση.

Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών ποικίλει από 5 έως 10 ώρες και εξαρτάται από διάφορους φυσικοχημικούς παράγοντες όπως είναι το pH του κυτταροπλάσματος, η θερμοκρασία, αλλά και οι αμυντικοί μηχανισμοί του κυττάρου και του οργανισμού.

Τα παραπάνω στάδια του κύκλου ζωής των εντεροϊών θα αναλυθούν περιληπτικά πιο κάτω:

A) η μόλυνση ξεκινάει με την **προσκόλληση των εντεροϊών** στα κύτταρα εκείνα που εκφράζουν στην επιφάνειά τους, τους κατάλληλους κυτταρικούς υποδοχείς όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Στην περίπτωση των εντεροϊών, οι υποδοχείς τους συνδέονται με συντηρημένες περιοχές των πρωτεϊνών VP1 και VP3 του καψιδίου. Οι περιοχές αυτές, όπως αναφέρθηκε βρίσκονται μέσα στο «φαράγγι» του καψιδίου, μακριά από τα αδιάκριτα «βλέμματα» των εξουδετερωτικών αντισωμάτων (Rossman et al., 2002). Αρχικά η κατανομή των ιοσωμάτων στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης είναι ομοιογενής σε όλη την έκταση αυτής. Μετά την σύνδεση όμως των υποδοχέων με τους αντίστοιχους δέκτες τους στα καψίδια αυτών, οι υποδοχείς μετακινούνται προς τις περιοχές εκείνες της κυτταρικής μεμβράνης οι οποίες στο εσωτερικό τους είναι επενδυμένες με κλαθρύνη, μία πρωτεΐνη η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό κυστιδίων μεταφοράς. Ακολουθεί η αναδίπλωση της κυτταρικής μεμβράνης και η είσοδος των ιών στα κύτταρα με ενδοκυττάρωση.

B) **Αποδιάταξη του καψιδίου και απελευθέρωση του γονιδιώματος στο κυτταρόπλασμα.** Αυτό επιτυγχάνεται είτε μέσω της δημιουργίας χαμηλού pH μέσα στα κυστίδια είτε μέσω της δράσης κάποιου συνυποδοχέα. Η οξינוποίηση του περιβάλλοντος επιτυγχάνεται μέσω μιας αντλίας πρωτονίων (H^+) των μεμβρανικών κυστιδίων μέσω κατανάλωσης ATP. Το όξινο περιβάλλον οδηγεί στην αποδιάταξη του καψιδίου, την απελευθέρωση υδρόφοβων πεπτιδικών περιοχών, οι οποίες μέσω της σύντηξης με τα λιπίδια της διπλοστιβάδας των μεμβρανών θα οδηγήσει τελικά στην απελευθέρωση του ιικού RNA.

Οι πολιοϊοί πάλι αλλάζουν στερεοδιάταξη μετά την σύνδεσή τους με τον υποδοχέα και μετατρέπονται στα καλούμενα ως A σωμάτια (Wimmer et al., 1993). Τα σωμάτια αυτά έχουν διαφοροποιημένη δομή που ευνοεί την απελευθέρωση υδρόφοβων περιοχών και την σύντηξή αυτών με τα λιπίδια της μεμβράνης.

Γ) Μετά την είσοδο του ιού στο κυτταρόπλασμα και την απελευθέρωση του γονιδιώματος **αρχίζει αμέσως η μετάφραση του θετικής πολικότητας RNA.** Οι

εντεροϊοί δεν διαθέτουν στο ώριμο ιόσωμα «έτοιμη» την RNA πολυμεράση και κανένα κυτταρικό ένζυμο δεν επιτελεί αυτή την διαδικασία. Επομένως πριν την αντιγραφή πρέπει να γίνει η διαδικασία της μετάφρασης. Βέβαια το ιικό RNA διαφέρει από τα μόρια mRNA των ευκαρυωτικών κυττάρων. Τα τελευταία όπως γνωρίζουμε διαθέτουν στο 5' άκρο τους ένα τροποποιημένο νουκλεοτίδιο γουανοσίνης γνωστό και ως καλύπτρα. Αντίθετα το RNA των εντεροϊών διαθέτει στο αντίστοιχο άκρο, όπως έχουμε αναφέρει, το μικρό πεπτίδιο VPg, το οποίο αφαιρείται από μία κυτταρική ελικάση (VPg-Unlinkase), άγνωστης ακόμα φυσιολογικής λειτουργίας (Gulevich et al., 2001). Τα ριβοσώματα προσδένονται με την μικρή υπομονάδα τους (40S) σε μία εσωτερική θέση δέσμησης (Internal Ribosome Entry Site-IRES), στην 5' αμετάφραστη περιοχή όπως αναφέραμε και στην παράγραφο για την δομή του γονιδιώματος και σαρώνουν την περιοχή αυτή μέχρι να συναντήσουν το κωδικόνιο έναρξης, κοντά στο οποίο προσδένεται και η μεγάλη υπομονάδα 60S. Στην έναρξη της μετάφρασης συμμετέχουν και οι περισσότεροι ευκαρυωτικοί παράγοντες έναρξης (eIFs).

Προϊόν της μετάφρασης αποτελεί μία πολυπρωτεΐνη, η οποία όμως είναι ασταθής και θα υποστεί πρωτεόλυση για την τελική παραγωγή των δομικών και των λειτουργικών πρωτεϊνών του εντεροϊού. Κατά το πρώτο στάδιο της πρωτεόλυσης αποχωρίζεται η δομική περιοχή P1 από τις λειτουργικές περιοχές P2 και P3 με την δράση της πρωτεάσης 2A. Στο επόμενο βήμα οι πρωτεάσες 3C και 3CD αποκόβουν τις δομικές και τις λειτουργικές πρωτεΐνες.

Δ) Η **αντιγραφή** του γονιδιώματος των εντεροϊών έχει ως σκοπό την παραγωγή νέων θετικής πολικότητας μορίων RNA(+). Για να γίνει αυτό, όπως είναι φανερό, πρέπει να δημιουργηθεί ένα ενδιάμεσο αρνητικής πολικότητας RNA(-), το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα. Η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα σε μεμβρανικά κυστίδια, τα οποία παράγονται από τις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου, της συσκευής Golgi και των λυσοσωμάτων του κυττάρου. Η δημιουργία των κυστιδίων αυτών επιτυγχάνεται με την δράση των ιικών πρωτεϊνών 2BC και 3C.

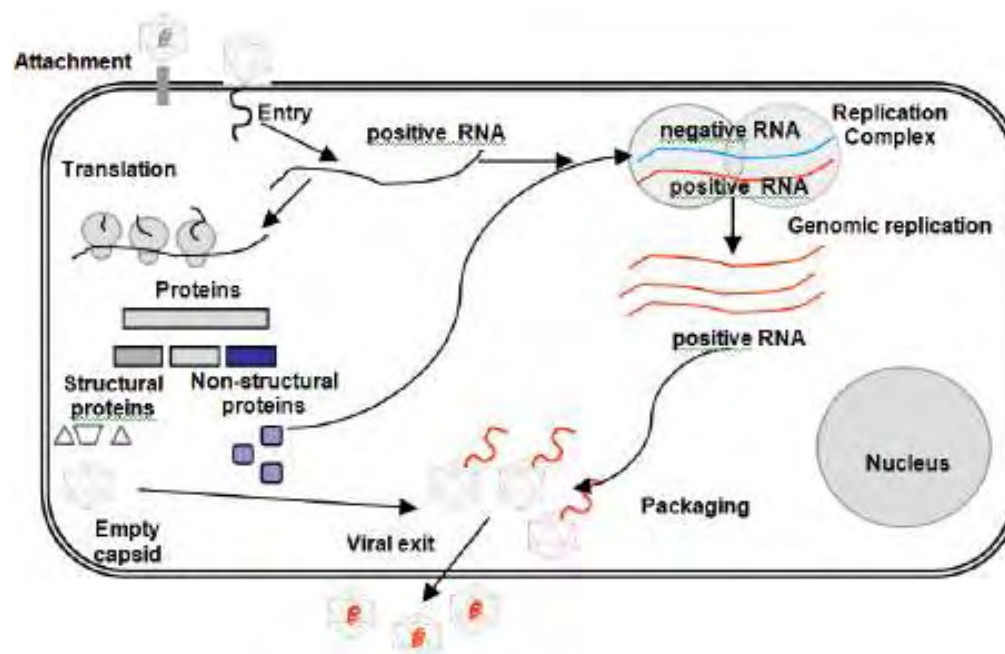
Αρχικά δημιουργείται ένα σύμπλοκο αντιγραφής, στο οποίο συμμετέχουν τόσο ιικές ($3CD^{pro}$, $3D^{pol}$) όσο και κυτταρικές πρωτεΐνες όπως η PABP (polyA Binding Protein) καθώς και οι δομές cloverleaf του 5' άκρου και η polyA ουρά του 3' άκρου. Αρχικά για την έναρξη της αντιγραφής απαιτείται η κυκλοποίηση του μορίου, ενώ η πρωτεΐνη VPg συμμετέχει ως εκκινητής της αντιγραφής.

Ε) Η **συναρμολόγηση** των νέων ιικών καψιδίων λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου. Η 5' UTR, που περιλαμβάνει ως γνωστόν τόσο το πολυπεπτίδιο VPg όσο και το στοιχείο IRES παίζει σημαντικό ρόλο στον εγκλεισμό των νέων ιικών μορίων RNA στα καψίδια, διαδικασία η οποία είναι γνωστή ως καψιδίωση. Αρχικά η ιική πρωτεάση $3CD^{pro}$ διασπά την P1, δηλαδή το τμήμα εκείνο της ιικής πολυπρωτεΐνης το οποίο περιλαμβάνει τις δομικές πρωτεΐνες στα συστατικά στοιχεία, δηλαδή στις VP0(VP2+VP4), VP1 και VP3. Οι 3 αυτές πρωτεΐνες, όπως έχουμε πει και στο κεφάλαιο για την δομή του καψιδίου, σχηματίζουν τα πρωτομερή (VP0+VP1+VP3), στην συνέχεια τα πενταμερή [(VP0+VP1+VP3)]₅ και

τέλος 12 πενταμερή ενώνονται και σχηματίζουν την πρόδρομη δομή του καψιδίου. Στην πρόδρομη αυτή μορφή κάθε πρωτεΐνη αντιπροσωπεύεται 60 φορές. Η πρόδρομη μορφή υφίσταται αυτοκαταλυτική διάσπαση στα δομικά της στοιχεία (VP2+VP4), αντίδραση ωρίμανσης και έτσι σχηματίζεται το ώριμο ιικό σωματίο (Pfister et al.,1999).

ΣΤ) Τα νέα ιικά σωματίια είναι πλέον ώριμα να απελευθερωθούν και να μολύνουν νέα κύτταρα. Η διαδικασία της **απελευθέρωσης** αυτών συνοδεύεται από τον θάνατο του μολυσμένου κυττάρου. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε δύο παράγοντες. Αφενός στον μεγάλο αριθμό των ιικών σωματιδίων και αφετέρου στην αναστολή της κυτταρικής πρωτεϊνοσύνθεσης από την ιική πρωτεάση 2A^{pro}. Η τελευταία φαίνεται ότι διασπά έναν από τους κυτταρικούς παράγοντες της μετάφρασης (Helen et al.,1991).

Στην εικόνα-4 που ακολουθεί στην επόμενη σελίδα φαίνεται ένα απλοποιημένο σχεδιάγραμμα του κύκλου ζωής των εντεροϊών.



Εικόνα-4: Κύκλος ζωής των εντεροϊών.

https://www.researchgate.net/figure/235733297_fig2_Figure-2-Enterovirus-lifecycle

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

1.Επιδημιολογία

Οι εντεροϊοί έχουν παγκόσμια κατανομή. Πάνω από το 50% των μολύνσεων από τους μη πόλιο-εντεροϊούς και πάνω από το 90% των μολύνσεων από τους ιούς της πολιομυελίτιδας είναι υποκλινικές. Στις περιπτώσεις δε εκείνες που τελικά αναπτύσσονται συμπτώματα, αυτά είναι μη ειδικά και συνδέονται με πυρετό. Μόνο μια μειοψηφία των μολύνσεων συνδέονται με ειδικά σύνδρομα. Ο χρόνος επώασης για τους περισσότερους εντεροϊούς κυμαίνεται από 2 έως 14 ημέρες, αλλά συνήθως είναι κάτω από μία εβδομάδα.

Οι λοιμώξεις από εντεροϊούς είναι πιο συχνές σε περιοχές με χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο, ειδικά σε εκείνες όπου επικρατούν συνθήκες συνωστισμού και το επίπεδο υγιεινής είναι χαμηλό. Οι λοιμώξεις συμβαίνουν πιο συχνά σε βρέφη και μικρά παιδιά. Σοβαρές λοιμώξεις συμβαίνουν πιο συχνά είτε τις πρώτες μέρες της ζωής (νεογνά), είτε σε μεγαλύτερα παιδιά και ενήλικες. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, στις οποίες τα παιδιά μολύνονται σε νεαρή ηλικία, η μόλυνση με πολιοϊό συνδέεται πιο σπάνια με παράλυση. Σε χώρες με καλύτερη υγιεινή, τα μεγαλύτερα παιδιά και οι ενήλικες είναι πιο πιθανά να είναι οροαρνητικοί και επομένως υπάρχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να νοσήσουν και να αναπτύξουν παράλυση. Η πιθανότητα συμπτωματικής λοίμωξης σε νεογνά μειώνεται με αντισώματα που περνούν παθητικά από την μητέρα στο παιδί. Τα μικρά παιδιά είναι οι πιο συχνές πηγές μόλυνσης εντεροϊών και αποτελούν κατά κανόνα τις αιτίες οικογενειακών εξάρσεων. Στα εύκρατα κλίματα οι μολύνσεις από εντεροϊούς συμβαίνουν πιο συχνά κατά την διάρκεια του καλοκαιριού και του φθινοπώρου.

Οι περισσότεροι εντεροϊοί μεταδίδονται μέσω της κοπρανο-στοματικής ή στοματικής-στοματικής οδού. Οι ασθενείς είναι πιο μολυσματικοί λίγο πριν έως και λίγο μετά την έναρξη συμπτωματικής νόσου, όταν ο ιός είναι παρών στα κόπρανα ή στον φάρυγγα. Η κατάποση μολυσμένου από εντεροϊούς φαγητού ή νερού μπορεί επίσης να προκαλέσει ασθένεια. Η αερογενής οδός είναι σημαντική για μερικούς εντεροϊούς οι οποίοι προκαλούν λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού, όπως είναι ο CAV21. Επίσης ο ιός EV70, ο οποίος προκαλεί οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτιδα μπορεί να μεταδοθεί απευθείας με ενοφθαλμισμό από τα δάκτυλα στα μάτια (Knipe and Howley,2007). Ακόμη οι εντεροϊοί μπορούν να μεταδοθούν μέσω του

πλακούνται από την μητέρα στο έμβρυο και να προκαλέσουν σημαντική νόσο στο νεογνό. Νοσοκομειακές λοιμώξεις έχουν συμβεί, αλλά μετάδοση μέσω μετάγγισης αίματος ή δήγματος εντόμων δεν έχει τεκμηριωθεί (Harrison's Principles of Internal Medicine 18th edition,p1594)

2.Παθογένεια και ανοσία

Η μόλυνση από τους εντεροϊούς ξεκινάει από το πεπτικό σύστημα, με εξαίρεση όπως αναφέραμε λίγους ιούς όπως ο CAV21, οι οποίοι προσβάλλουν το αναπνευστικό σύστημα. Οι ιοί πολλαπλασιάζονται στα επιθηλιακά κύτταρα και στην συνέχεια μέσω των λεμφαγγείων του βλεννογόνου μεταφέρονται στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα (ο οποίος είναι οργανωμένος στις πλάκες του Peyer) και του λεπτού εντέρου. Κατά την φάση αυτή η λοίμωξη είναι συνήθως ασυμπτωματική ή μπορεί να εκδηλωθεί με ήπια και μη ειδικά συμπτώματα, όπως πυρετός, αρθραλγίες-μυαλγίες. Στην συνέχεια ο ιός μεταφέρεται στους λεμφαδένες και ξεκινάει η φάση της ιαιμίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις μετά την φάση της ιαιμίας ο ιός μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε διάφορους ιστούς και όργανα προκαλώντας συμπτωματική νόσο. Ο ιός μπορεί να ανιχνευτεί στον φάρυγγα και το αίμα και να απομονωθεί από τα κόπρανα 3 με 5 ημέρες μετά την έκθεση.

Η χυμική και η εκκριτική (IgA) ανοσία στο γαστρεντερικό σύστημα είναι πολύ σημαντική για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού του ιού. Οι εντεροϊοί προκαλούν την παραγωγή ειδικής ανοσοσφαιρίνης IgM, η οποία διατηρείται για κάτω από 6 μήνες και ανοσοσφαιρίνη IgG η οποία διατηρείται για όλη τη ζωή. Η καψιδιακή πρωτεΐνη VP1 αποτελεί τον κύριο στόχο των εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Τα αντισώματα προσφέρουν ισόβια ανοσία έναντι νόσησης για τον ίδιο ορότυπο, αλλά δεν προλαμβάνουν την μόλυνση ή και την αποβολή του ιού. Ασθενείς με διαταραχές της κυτταρικής ανοσίας δεν εμφανίζουν ιδιαίτερα σοβαρές λοιμώξεις από εντεροϊούς. Αντίθετα ασθενείς με αγαμιασφαιριναιμία, εμφανίζουν απειλητικές για την ζωή λοιμώξεις, υπογραμμίζοντας τη σημασία της χυμικής ανοσίας για τον έλεγχο των εντεροϊών. Γενικευμένες λοιμώξεις έχουν εμφανιστεί σε ασθενείς που έχουν υποστεί μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Το μητρικό γάλα με τις ειδικές ανοσοσφαιρίνες IgA που περιέχει μπορεί να προστατεύσει τα βρέφη ενάντια στις λοιμώξεις από εντεροϊούς.

Στην συνέχεια του κεφαλαίου θα αναφέρουμε ασθένειες που προκαλούνται από εντεροϊούς.

Λοιμώξεις από πολιοϊούς: οι πιο πολλές λοιμώξεις είναι ασυμπτωματικές. Ένα μικρό ποσοστό περίπου 5% θα εμφανίζει μη ειδική νόσο που εκδηλώνεται με αρθραλγίες, μυαλγίες, πυρετό και ανορεξία. Ένα ποσοστό 1% θα εμφανίσει άσηπτη

μηνιγγίτιδα (μη παραλυτική πολιομυελίτιδα). Η πιο σπάνια εκδήλωση είναι αυτή της παραλυτικής πολιομυελίτιδας.

Α) Παραλυτική πολιομυελίτιδα: Αρχικά εκδηλώνεται με συμπτωματολογία άσηπτης μηνιγγίτιδας, η οποία διαρκεί μία έως μερικές ημέρες και στην συνέχεια ακολουθείται από σοβαρό αυχενικό και μυϊκό πόνο και από κινητική αδυναμία. Σε ορισμένες περιπτώσεις η νόσος φαίνεται να είναι διφασική, δηλαδή το αρχικό στάδιο της άσηπτης μηνιγγίτιδας φαίνεται να ακολουθείται από ύφεση των συμπτωμάτων και στην συνέχεια εμφανίζεται πυρετός και παράλυση. Αυτός ο τύπος είναι πιο συχνός στα παιδιά σε σχέση με τους ενήλικες. Η αδυναμία είναι γενικά ασύμμετρη και μπορεί να εμφανιστεί στα πόδια (πιο συχνά), τα χέρια, την κοιλιά ή το στήθος ή και τους μύες του φάρυγγα. Η παράλυση εμφανίζεται συνήθως κατά την εμπύρετη φάση της νόσου και συνήθως δεν επιδεινώνεται μετά την ύφεση του πυρετού. Η κλινική εξέταση δείχνει ελαττωμένα αντανακλαστικά στα παραλυμένα σημεία. Η παράλυση των μυών του φάρυγγα μπορεί να οδηγήσει σε δυσφαγία, αδυναμία κατάποσης των σάλιων ή και δυσφωνία. Σε σοβαρές περιπτώσεις προσβολής των μεσοπλευρίων νεύρων, του φρενικού νεύρου ή και του αναπνευστικού κέντρου, σε συνδυασμό με εισρόφηση, μπορεί να οδηγήσει σε κυκλοφορική καταπληξία. Οι πιο πολλοί ασθενείς με παράλυση εμφανίζουν συνήθως κάποια βελτίωση μετά από εβδομάδες ή μήνες από την λοίμωξη. Η παραλυτική νόσος είναι πιο συχνή σε ηλικιωμένους και εγκύους, καθώς και σε ασθενείς με τραύμα κατά την διάρκεια της προσβολής. Δύο ειδικές μορφές παραλυτικής πολιομυελίτιδας αξίζει να αναφερθούν:

1) Πολιομυελίτιδα μετά από εμβολιασμό (Vaccine-associated poliomyelitis): οφείλεται σε ζώντα ιό (OPV). Το ρίσκο νόσησης από πολιομυελίτιδα μετά από εμβολιασμό με OPV έχει υπολογιστεί στις 1 ανά 2,5 εκατομμύρια δόσεις. Πριν από το 1997 παρατηρούνταν κατά μέσο όρο 8 περιπτώσεις της ανεπιθύμητης ενέργειας ανά χρόνο. Μετά την εισαγωγή του σχήματος αδρανοποιημένου ιού (IPV) και OPV τελικά μετά την χρήση μόνο του IPV τα περιστατικά άρχισαν να υποχωρούν. Κανένα περιστατικό δεν έχει αναφερθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες μετά το 1999.

2) Σύνδρομο μετά από πολιομυελίτιδα (postpolio syndrome) : Το σύνδρομο αυτό εκδηλώνεται με νέα έναρξη αδυναμίας, καταβολής, πόνου και ατροφίας μυών που είχαν προσβληθεί κατά την πρώτη προσβολή 20-40 χρόνια αργότερα. Το σύνδρομο αυτό είναι πιο συχνό στις γυναίκες. Η έναρξη είναι ύπουλη και η αδυναμία μπορεί περιστασιακά να επεκταθεί και σε μύες που δεν είχαν προσβληθεί την τελευταία φορά. Η πρόγνωση είναι γενικά καλή. Πιστεύεται ότι οφείλεται σε δυσλειτουργία και απώλεια εφεδρικών νευρώνων και όχι σε αναζωπύρωση της λοίμωξης από πολιοϊό.

Εκτός από την πολιομυελίτιδα, σύνδρομα και ασθένειες προκαλούνται και από άλλους πολιοϊούς:

Β) Μη ειδική εμπύρετη νόσος: αποτελεί την πιο συνηθισμένη κλινική εκδήλωση λοίμωξης με εντεροϊό και εκδηλώνεται συνήθως κατά τους θερινούς μήνες.

Γ) Γενικευμένη νόσος των νεογνών: εκδηλώνεται σε βρέφη και μικρά παιδιά ηλικίας μέχρι 3 μηνών και μοιάζει με βακτηριακή σήψη με πυρετό, ευερεθιστότητα ή/και λήθαργο.

Δ) Άσηπτη μηνιγγίτιδα και εγκεφαλίτιδα: Σε παιδιά και νέους ενήλικες οι εντεροϊοί αποτελούν πάνω από το 90% των περιπτώσεων άσηπτης μηνιγγίτιδας στις οποίες μπορεί να απομονωθεί αιτιολογικός παράγοντας. Η εγκεφαλίτιδα από εντεροϊό είναι πολύ πιο σπάνια.

Ε) Πλευροδυνία (νόσος Bornholm): Οι περισσότερες περιπτώσεις οφείλονται σε ιούς Coxsackie B κατά την διάρκεια επιδημιών. Οι ασθενείς παρουσιάζουν πυρετό και κρίσεις θωρακικού (πλευριτικού) ή κοιλιακού πόνου. Τα συμπτώματα διαρκούν λίγες μέρες και υποχωρούν μόνα τους. Η αντιμετώπιση είναι συμπτωματική και περιλαμβάνει αντιφλεγμονώδη φάρμακα.

ΣΤ) Μυοκαρδίτιδα και περικαρδίτιδα: Οι εντεροϊοί προκαλούν περίπου το 1/3 των περιπτώσεων οξείας μυοκαρδίτιδας. Coxsackie B ιοί και το RNA τους έχει απομονωθεί από το περικαρδιακό υγρό. Οι περισσότερες περιπτώσεις συμβαίνουν σε νεογνήνητα, εφήβους ή νέους ενήλικες.

Ζ) Εξανθήματα: Ιοί Echo 9 και 16 αποτελούν συχνές αιτίες παιδικών εξανθημάτων το καλοκαίρι και το φθινόπωρο.

Η) Νόσος χεριών-ποδιών-στόματος: Αποτελεί ήπια νόσο της παιδικής ηλικίας, εξαιρετικά μεταδοτική και εκδηλώνεται με πυρετό, ανορεξία, κακουχία και φυσαλίδες στον στοματικό βλεννογόνο και συχνά στα πόδια και χέρια. Οφείλεται συνήθως σε CVA16 ή EV71

Θ) Οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτιδα: επιδημίες στην κοινότητα και νοσοκομειακές έχουν συσχετισθεί με CVA24 και EV70.

Ι) Herpangina: Οφείλεται συνήθως στον ιό Coxsackie A και εκδηλώνεται με πυρετό, πόνο και εξανθήματα που μπορούν να εξελκωθούν στο στόμα.

Τέλος άλλες ασυνήθιστες εκδηλώσεις των εντεροϊών είναι η πνευμονία της παιδικής ηλικίας και το κοινό κρυολόγημα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι εντεροϊοί (Coxsackie-B), έχουν απομονωθεί, κατά την νεκροψία, από πάγκρεας παιδιών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1. Παρόλα αυτά στις περισσότερες περιπτώσεις η προσπάθεια για απομόνωση του ιού αποβαίνει άκαρπη. Τέλος άλλες ασθένειες οι οποίες έχουν συσχετισθεί, μεταξύ άλλων, με εντεροϊούς είναι η παρωτίτιδα,

βρογχίτιδα, βρογχιολίτιδα, λοιμώδης λεμφοκυττάρωση, πολυμυοσίτιδα, οξεία αρθρίτιδα και οξεία νεφρίτιδα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

1.Εισαγωγικά

Οι κυκλοφορόντες εντεροϊοί παρουσιάζουν εκρηκτικά μεγάλη γενετική ετερογένεια. Η μεγάλη αυτή γενετική ποικιλότητα των εντεροϊών σχετίζεται με δύο παράγοντες: α) Τις μεταλλάξεις και β) τον γενετικό ανασυνδυασμό.

2.Μεταλλάξεις

Η αντιγραφή των εντεροϊών χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό σημειακών μεταλλάξεων και αυτό γιατί η ιική RNA-πολυμεράση δεν έχει τη δυνατότητα ελέγχου της πιστότητας της αντιγραφής (proof reading). Η συχνότητα λάθους για κάθε κύκλο αντιγραφής των εντεροϊών έχει υπολογιστεί στις 10^{-4} έως 10^{-5} για κάθε ζεύγος βάσεων (Ward et al.,1992). Για να δοθεί ένα μέτρο σύγκρισης, η πιθανότητα λάθους για τις DNA πολυμεράσες κυμαίνεται από 10^{-8} έως 10^{-11} . Η μεγάλη συχνότητα των μεταλλάξεων οδηγεί τελικά στην δημιουργία ενός πληθυσμού ιών, τα μέλη του οποίου εμφανίζουν μεγάλη ποικιλότητα γονοτύπων. Η ποικιλότητα αυτή επηρεάζει την ικανότητα επιβίωσης των διαφόρων μελών ενός πληθυσμού. Έτσι το πλέον σωστό είναι να μιλάμε όχι για ένα συγκεκριμένο είδος ενός ιού αλλά για ένα «σχεδόν-είδος»- quasi species, τα μέλη του οποίου διαθέτουν ξεχωριστό εξελικτικό πλεονέκτημα. Ένα άγριο στέλεχος μπορεί να χαρακτηριστεί ως «quasi species», όταν ο πληθυσμός του δεν αποτελείται από μονάδες που έχουν μεν μία κοινή αλληλουχία αλλά όχι και μοναδική (Domingo et al.,1985)

Οι περιοχές του ιικού γενώματος που εμφανίζουν την μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων είναι αυτές που κωδικοποιούν τις καψιδιακές πρωτεΐνες και μάλιστα

εκείνες οι οποίες είναι εκτεθειμένες στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και δέχονται την μεγαλύτερη πίεση φυσικής επιλογής. Αυτές είναι όπως έχουμε πει οι VP1, VP2 και VP3. Μάλιστα το γονίδιο που κωδικοποιεί την καψιδιακή πρωτεΐνη VP1 δέχεται την μεγαλύτερη πίεση φυσικής επιλογής από το ανοσοποιητικό σύστημα με αποτέλεσμα την δημιουργία ποικιλόμορφων οροτύπων. Αλλά και άλλες περιοχές του γονιδιώματος συσσωρεύουν μεταλλάξεις με συνέπεια πολλές φορές να υπάρχει αναντιστοιχία στο περιβαλλοντικό στέλεχος και τον ορότυπο, ο οποίος βασίζεται στα εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι της VP1 περιοχής. Με βάση όλα τα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι δομικές, λειτουργικές και οι μη κωδικές περιοχές εξελίσσονται ανεξάρτητα και ότι το γένωμα των εντεροϊών αποτελεί άθροιση μιας μεγάλης ποικιλότητας γονοτύπων (εξελικτικών μονάδων) (Lukashev et al., 2003).

3. Ανασυνδυασμός

Το φαινόμενο του ανασυνδυασμού μεταξύ των εντεροϊών είναι καλά μελετημένο. Το φαινόμενο του ανασυνδυασμού πρωτοπαρατηρήθηκε στους πολιοϊούς οι οποίοι είναι και οι πρώτοι εντεροϊοί (και RNA ιοί) γενικότερα που μελετήθηκαν ενδελεχώς. Οι πρώτες αναφορές προέρχονται από πειράματα επιμόλυνσης κυττάρων με δύο μεταλλαγμένα στελέχη πολιοϊών τύπου I (Hirst 1962, Lendinko 1963). Το ένα στέλεχος προκαλούσε αντίσταση στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη και το άλλο σε ορό αλόγου. Τα πειράματα έδειξαν ότι η εμφάνιση διπλά ανθεκτικών στελεχών ήταν 15-20 φορές μεγαλύτερη από εκείνη που θα αναμενόταν με βάση τον ρυθμό μεταλλαξιογένεσης.

Ανασυνδυασμένοι πολιοϊοί έχουν βρεθεί και σε πολλά κλινικά δείγματα. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στο εμβόλιο OPV, το οποίο παρασκευάζεται από ζώντες εξασθενημένους ιούς και περιέχει και τους τρεις ορότυπους του ιού (Sabin1-3). Αυτό έχει ως συνέπεια να δημιουργείται πρόσφορο περιβάλλον για την ανταλλαγή γενετικού υλικού. Τα κλινικά δείγματα που περιέχουν τους ανασυνδυασμένους πολιοϊούς προέρχονται τόσο από υγιή άτομα (Gammack et al., 1989), όσο και από άτομα που έχουν αναπτύξει μια σπάνια ανεπιθύμητη ενέργεια που ονομάζεται παραλυτική πολιομυελίτιδα που σχετίζεται με εμβολιασμό (Vaccine Associated Paralytic Poliomyelitis, VAPP). Τα στελέχη αυτά που είναι μολυσματικά ονομάζονται κυκλοφορούντες πολιοϊοί που προέρχονται από εμβολιασμό (circulating vaccine associated polioviruses). Τα περισσότερα γεγονότα ανασυνδυασμού φαίνεται ότι αφορούν τις λειτουργικές περιοχές του γονιδιώματος (Georgoroulou and Markoulatos, 2001, Paximadi et al., 2006).

Μετά την παγκόσμια εξάλειψη της πολιομυελίτιδας, αυξήθηκε το ενδιαφέρον για τη μελέτη των μη πόλιο εντεροϊών. Η αλληλούχηση του γονιδιώματος των πρότυπων στελεχών έδειξε γεγονότα ανασυνδυασμού στις μη καψιδικές περιοχές.

Αναλυτικότερα η αλληλούχηση του πρότυπου στελέχους Coxsackie A21 (ο οποίος ανήκει στο είδος C των ανθρώπινων εντεροϊών, HEVC), έδειξε ότι εμφανίζει εκτεταμένη ομολογία με τους πολιοϊούς στις μη καψιδιακές περιοχές (Hughes et al., 1989). Ανασυνδυασμοί έχουν δειχθεί επίσης, μέσω σύγκρισης ολόκληρων των γονιδιωμάτων, μεταξύ των ιών που ανήκουν στο είδος HEVC (Brown et al., 2003). Με τον ίδιο τρόπο έχουν δειχθεί γεγονότα ανασυνδυασμού μεταξύ των ιών που ανήκουν στο είδος HEVB (Oberste et al., 2004). Τέλος γεγονότα ανασυνδυασμού έχουν δειχθεί στην 5'-UTR μεταξύ των εντεροϊών των ειδών HEVA και HEVB, και στην αντίστοιχη περιοχή μεταξύ των ειδών HEVC και HED (Santti et al., 1999).

Το φαινόμενο του ανασυνδυασμού έχει παρατηρηθεί εκτενώς και μεταξύ κυκλοφορούντων στελεχών εντεροϊών, δηλαδή στελεχών τα οποία έχουν απομονωθεί από περιβαλλοντικά δείγματα και από ασθενείς. Αλληλούχηση γονιδιωμάτων κυκλοφορούντων στελεχών έχει αναδείξει φαινόμενα ανασυνδυασμού σε στελέχη του είδους CAV9 (Santti et al., 2000) καθώς και σε στελέχη Echo ιών E11 (Lukashev et al., 2004). Η συντριπτική πλειοψηφία των ανασυνδυασμών παρατηρείται στις περιοχές εκείνες του γονιδιώματος που κωδικοποιούν για τις μη καψιδιακές πρωτεΐνες και συγκεκριμένα στις περιοχές 2ABC και 3D (Lukashev et al., 2005 και Bolanaki et al., 2007).

4. Μηχανισμοί ανασυνδυασμού

Δύο πιθανοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τον εκτεταμένο γενετικό ανασυνδυασμό μεταξύ των εντεροϊών:

A) Μηχανισμός αλλαγής μήτρας: Κατά την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, όπως έχουμε αναφέρει και στο κεφάλαιο για τον κύκλο ζωής των εντεροϊών, η ιική RNA-εξαρτώμενη RNA-πολυμεράση συνθέτει νέους συμπληρωματικούς κλώνους RNA, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τον θετικής πολικότητας κλώνο. Κατά την διάρκεια της διαδικασίας αυτής δημιουργείται ένα προσωρινό δίκλωνο μόριο RNA, που καλείται αντιγραφικό ενδιάμεσο. Σύμφωνα με τον μηχανισμό αυτό η RNA πολυμεράση μπορεί να συναντήσει ένα εμπόδιο και να σταματήσει. Στην συνέχεια μεταπηδά σε ένα άλλο μόριο RNA «κουβαλώνοντας» μαζί της και τον νεοσυντιθέμενο κλώνο και χρησιμοποιώντας το νέα αυτό μόριο ως μήτρα συνεχίζει την αντιγραφή. Το εμπόδιο αυτό μπορεί να είναι είτε μια δευτεροταγής δομή του RNA, είτε η προσθήκη ενός λάθους νουκλεοτιδίου (Romanova et al., 1986, Paximadi et al., 2008). Το σύμπλοκο RNA-πολυμεράση και θετικός κλώνος RNA προσδένεται σε ένα μόριο RNA, το οποίο έχει υψηλή ομολογία με αυτό. Αν η μετάβαση αυτή είναι ακριβής ο ανασυνδυασμός θα είναι ομόλογος και δεν θα έχει επίπτωση στην λειτουργικότητα των νέων RNA μορίων.

Ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας προτάθηκε το 1986 από τους Baltimore και Kirkegaard και είναι γνωστός και ως αντιγραφικός μηχανισμός (Kirkegaard and Baltimore.,1986) και θεωρείται ο πιθανότερος μηχανισμός ανασυνδυασμού.

Β) Μηχανισμός ρήξης σύνδεσης: Σύμφωνα με τον δεύτερο αυτό προτεινόμενο μηχανισμό, μόρια RNA σπάνε σε ορισμένα σημεία και στην συνέχεια τα ελεύθερα 5' άκρα διαφορετικών μορίων συνδέονται και πάλι δημιουργώντας νέα ανασυνδυασμένα μόρια. Η αρχική διάσπαση των μορίων προκαλείται από προσβολή των φωσφοδιεστερικών δεσμών από ένα νουκλεόφιλο μόριο είτε εσωτερικό (μία παρακείμενη ομάδα OH), είτε εξωτερικό (πχ από ένα μόριο H₂O). Στην πρώτη περίπτωση δημιουργείται μία δομή διακλάδωσης από τα ελεύθερα άκρα, τα οποία ενώνονται με την ενεργοποίηση της 5' φωσφορικής ομάδας και την δημιουργία νέου φωσφοδιεστερικού δεσμού με μία ελεύθερη υδροξυλική ομάδα. Στην δεύτερη περίπτωση η προσβολή του φωσφοδιεστερικού δεσμού από το εσωτερικό νουκλεόφιλο έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός 2',3' κυκλικού φωσφορικού ενδιάμεσου, το οποίο θα σχηματίσει στην συνέχεια με μία 3'-υδροξυλική ομάδα έναν νέο φωσφοδιεστερικό δεσμό. Ο μηχανισμός αυτός είναι γνωστός και ως μη αντιγραφικός μηχανισμός και περιγράφηκε το 1999 (Gmyl et al.,1999)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

1.Περιβαλλοντικά δείγματα

Από τα διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα τα αστικά λύματα αποτελούν την πιο κατάλληλη πηγή απομόνωσης των εντεροϊών και αυτό γιατί περιέχουν μεγάλη ποσότητα κοπράνων και όπως αναφέραμε οι άνθρωποι φορείς των εντεροϊών αποβάλουν τους ιούς κατά κύριο λόγο με τα κόπρανα. Άλλες πηγές απομόνωσης αποτελούν τα βιομηχανικά λύματα, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείγματα για απομόνωση ακόμα και μεγάλοι όγκοι νερού από ποτάμια και λίμνες. Παρόλα αυτά τα αστικά λύματα αποτελούν τα συνηθέστερα περιβαλλοντικά δείγματα απομόνωσης εντεροϊών (Muir et al.,1988)

2.Κλινικά δείγματα

Οι εντεροϊοί μπορούν να απομονωθούν από μία μεγάλη ποικιλία κλινικών δειγμάτων. Η απομόνωση από κόπρανα ή στοματοφαρυγγικά επιχρίσματα ασθενών είναι συχνά θετική, αλλά από μόνη της δεν αποδεικνύει νόσο, γιατί οι περιοχές αυτές επιμολύνονται για εβδομάδες μετά από υποκλινική νόσο. Η απομόνωση του ιού από τον λαιμό έχει μεγαλύτερη κλινική σημασία σε σχέση με την απομόνωση από τα κόπρανα γιατί οι ιοί συνήθως παραμένουν εκεί για λιγότερο χρονικό διάστημα. Απομόνωση του ιού από δείγματα όπως εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ορός αίματος ή από υγρά κοιλότητων του σώματος είναι λιγότερο συχνά θετικά αλλά το θετικό αυτό αποτέλεσμα από τα υγρά αυτά είναι ενδεικτικό νόσου από εντεροϊό.

Για την απομόνωση και την ταυτοποίηση των εντεροϊών από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα μπορούν να εφαρμοστούν οι ακόλουθες τεχνικές.

A) Απομόνωση και καλλιέργεια του ιού σε ειδικές κυτταρικές σειρές:

Η διαδικασία αυτή βασίζεται στον ενοφθαλμισμό κατάλληλων δειγμάτων σε ειδικές κυτταρικές σειρές και παρατήρηση της κυτταροπαθογόνου δράσης των ιών στα κύτταρα μετά από λίγες ημέρες. Τα κύτταρα στρογγυλοποιούνται και συρρικνώνονται πριν αποκολληθούν από την επιφάνεια ανάπτυξης της καλλιέργειας. Η επιλογή της κυτταρικής σειράς που θα χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση των εντεροϊών είναι ιδιαίτερα σημαντική, γιατί δεν πολλαπλασιάζονται όλοι οι ορότυποι στην ίδια κυτταρική σειρά. Η συνηθισμένη τακτική είναι να χρησιμοποιούνται διάφοροι συνδυασμοί κυτταρικών σειρών, έτσι ώστε να αυξηθεί το εύρος των εντεροϊών που μπορούν να ανιχνευθούν (Knipe and Howley, 2007). Οι πιο συνηθισμένες κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση εντεροϊών είναι τα κύτταρα RD (κύτταρα ανθρώπινου ραβδομυοσάρκωματος), τα κύτταρα HEP-2 (κύτταρα ανθρώπινου καρκινώματος του τραχήλου της μήτρας) και τέλος η κυτταρική σειρά L₂₀B, η οποία αποτελείται από κύτταρα ποντικού, τα οποία έχουν υποστεί γενετικό ανασυνδυασμό, έτσι ώστε να εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον υποδοχέα των εντεροϊών, PVR (Knipe and Howley, 2007). Η μέθοδος αυτή αν και ανιχνεύει την παρουσία του ιού, δεν μπορεί να μας αποκαλύψει τον ορότυπο, καθώς διαφορετικοί ιοί προκαλούν τις ίδιες κυτταροπαθογόνες αλλοιώσεις.

B) Οροτυπική ταυτοποίηση:

Μετά την απομόνωση του ιού στις κυτταρικές σειρές μπορεί να γίνει η ταυτοποίησή τους με ειδικούς αντιορούς. Λόγω της πληθώρας των οροτύπων χρησιμοποιούνται μείγματα αντιορών που παράγονται σε άλογα και περιέχουν διάφορους συνδυασμούς αντισωμάτων. Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά αξιόπιστη αλλά δυστυχώς αρκετά χρονοβόρα. Επιπλέον με τις ορολογικές μεθόδους δεν είναι δυνατόν να ταυτοποιήσουμε νέους οροτύπους. Για τους παραπάνω λόγους, πλέον, χρησιμοποιούνται οι μοριακές τεχνικές.

Γ)Μοριακές τεχνικές:

Υπάρχουν διάφορες μοριακές τεχνικές οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς, όπως είναι ο *in situ* υβριδισμός με την χρήση cDNA ανιχνευτών. Η μέθοδος όμως αυτή δεν είναι αρκετά ευαίσθητη για την χρήση σε κλινικά δείγματα (όπως το πλευριτικό και το περικαρδιακό υγρό ή το εγκεφαλονωτιαίο υγρό), ούτε και για την ακριβή ταυτοποίηση του υπεύθυνου ιού. Σήμερα πλέον η πιο ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των εντεροϊών είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με την χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR). Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη τόσο για κλινικά όσο και για περιβαλλοντικά δείγματα (Kessler et al.,1997, Olive et al.,1990). Χάρη στην αλληλούχηση μεγάλου αριθμού κυκλοφορούντων στελεχών εντεροϊών έγινε δυνατός ο εντοπισμός συντηρημένων περιοχών. Από τις περιοχές αυτές η 5'UTR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της παρουσίας εντεροϊού σε κάποιο δείγμα (Kyriakopoulou et al.,2012). Για την ταυτοποίηση όμως του οροτύπου, η περιοχή αυτή δεν είναι κατάλληλη διότι παρουσιάζει αρκετά μεγάλη ομοιογένεια. Έτσι η ταυτοποίηση βασίζεται σε εκκινητές που έχουν σχεδιαστεί έναντι της καψιδιακής πρωτεΐνης VP1. Για τον σκοπό αυτό έχουν σχεδιαστεί ειδικοί εκφυλισμένοι εκκινητές για την RT-PCR που καλύπτουν όλο το φάσμα των οροτύπων (Oberste et al.,2003). Μετά την ενίσχυση της VP1 περιοχής ακολουθεί η αλληλούχηση αυτής και η σύγκρισή της με τις κατατεθειμένες αλληλουχίες. Για την ταυτοποίηση του ιού θα πρέπει η νουκλεοτιδική του αλληλουχία στην συγκεκριμένη περιοχή (VP1) να έχει ομοιότητα με το πρότυπο στέλεχος >75%. Εάν αυτή είναι κάτω από 70%, τότε μιλάμε για νέο ορότυπο. Η αλληλούχηση της VP1 περιοχής του γονιδιώματος αποτελεί έναν ακριβή τρόπο ταυτοποίησης των κυκλοφορούντων στελεχών των εντεροϊών (Bolonaki et al.,2006, Caro et al., 2001, Oberste et al.,2000, Kottaridi et al., 2006)

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας ήταν να εξηγηθεί η φυλογενετική σχέση του στελέχους Gior, το οποίο ανήκει στον ορότυπο Echovirus-30 (E-30) και να μελετηθεί το φαινόμενο του ανασυνδυασμού στην περιοχή του γονιδιώματος των εντεροϊών μεταξύ της 5'αμετάφραστης περιοχής (5'-UTR) και της VP1 καψιδιακής πρωτεΐνης.

Σε προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας ,χρησιμοποιώντας την τεχνική του πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLP) στην 5' UTR κλινικών στελεχών εντεροϊών που απομονώθηκαν στην Ελλάδα, παρατηρήθηκαν ασυμβατότητες στην τοπολογία του συγκεκριμένου στελέχους στα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν με βάση την 5' UTR και την VP1 καψιδιακή πρωτεΐνη (Kyriakopoulou et al.,2013).

Στην παρούσα μελέτη αλληλουχίσαμε ολόκληρο το στέλεχος Gior. Στην συνέχεια ανατρέξαμε στην GenBank και με βάση τις καταχωρημένες αλληλουχίες των εντεροϊών E-30 κατασκευάσαμε τα φυλογενετικά δέντρα με βάση την 5' UTR και την VP1 καψιδιακή πρωτεΐνη. Τέλος πραγματοποιήσαμε **ανάλυση σχεδίασης ομοιότητας (Similarity Plot analysis)**, αλληλουχιών για την ανίχνευση ανασυνδυασμών στην 5'αμετάφραστη περιοχή.

ΜΕΡΟΣ II

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:

1. Περιγραφή των ιικών στελεχών

Το στέλεχος Gior απομονώθηκε το 2001 από δείγματα κοπράνων, τα οποία συλλέχτηκαν κατά την διάρκεια επιδημίας άσηπτης μηνιγγίτιδας στην Ελλάδα το 2001. Το συγκεκριμένο στέλεχος χαρακτηρίστηκε στην συνέχεια με ορολογικές μεθόδους και με μερική αλληλούχιση της VP1 περιοχής του γονιδιώματος και ταυτοποιήθηκε ότι ανήκει στον ορότυπο Echo30 (E-30). Το συγκεκριμένο στέλεχος διατηρείται στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του Πανεπιστημίου μας σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινου ραβδομυοσάρκωματος (Rd).

2. Εκχύλιση του ιικού RNA

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του ιικού RNA με την διαδικασία της εκχύλισης από τα νεοπλασματικά κύτταρα. Η διαδικασία της απομόνωσης του RNA στο εργαστήριο απαιτεί την λήψη αυστηρών προφυλάξεων και αυτό γιατί το μόριο αυτό είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στην διάσπαση από της «πανταχού παρούσες» RNAασες, ένζυμα τα οποία μπορούν να αναδιαταχθούν ακόμα και με αυτοκατάλυση και να καταστούν ενεργά.

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN), χημικό μόριο το οποίο έχει την ικανότητα να αποδιατάσει τις διάφορες RNAσες (Casas et al.,1995).

Αναλυτικότερα, μέσα σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης τύπου Eppendorf των 2ml παρασκευάστηκε διάλυμα αποτελούμενο από:

- α) 100 µl κυτταροκαλλιέργειας.
- β) 10 µl διαλύματος γλυκογόνου 100mg/ml
- γ) 300µl διαλύματος θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) 4M

Διάλυμα θειοκυανιούχου γουανιδίνης: 4M GuSCN, 0,5% N-Lauroyl sarcosine, 1mM dithiothreitol, 25 mM sodium citrate (Merck, Germany)

Το διάλυμα αναδεύτηκε και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου (~22°C) για 20 λεπτά, έτσι ώστε να διαλυθούν οι κυτταρικές μεμβράνες, να αποδιαταχθούν οι κυτταρικές πρωτεΐνες και να απελευθερωθούν τα μόρια RNA. Στην συνέχεια προσθέσαμε στα Eppendorf 400 μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C) και το διάλυμα καταψύχθηκε στους -20°C για 20 λεπτά. Μετά το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 14.000rcf για 10 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα που προέκυψε διαλύθηκε σε όγκο 500 μl παγωμένου διαλύματος αιθυλικής αλκοόλης συγκέντρωσης 70% και φυγοκεντρήθηκε και πάλι στις 14.000rcf για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα που προέκυψε διαλύθηκε σε 100μl διπλά αποσταγμένου νερού και το διάλυμα που προέκυψε καταψύχθηκε στους -20°C και αποθηκεύτηκε στο εργαστήριο μας για μελλοντική χρήση.

3.Μόρια εκκινητές

Στον πίνακα 3 που ακολουθεί περιγράφονται τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήσαμε. Όπως φαίνεται τα περισσότερα από αυτά προήλθαν από την διεθνή βιβλιογραφία, ενώ κάποια σχεδιάστηκαν για τις ανάγκες της εργασίας με την χρήση του προγράμματος Primer 3.

Εκκινητής	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Βιβλιογραφία
72437 ENV flapR	001-020	Sense	TTAAAACAGCTCTGGGGTTG	Mulders et al., 1999 Afonina et al., 2007
	462-489	Antisense	AATAAATCATAAGGATTGCCGCATTC	
UG52 UC53	167-187	Sense	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	Georgopoulou et al. 2000 Georgopoulou et al. 2000
	583-601	Antisense	TTGTCACCATAACCAGCCA	
ENV2 1200R	456-474	Sense	CCCCTGAATGCGGCTAATC	Bessaud et al., 2008 Lukashev et al., 2005
	1179-1198	Antisense	GGGAATTTCCACCACCACCC	
Gior 1051 F Gior 1758 R	1051-1071	Sense	GTTGTGGGATACGGAGTGTG	Παρούσα εργασία
	1738-1758	Antisense	ATTCAATTGTGGGCAAACCTT	
ENV2 UC20	456-474	Sense	CCCCTGAATGCGGCTAATC	Bessaud et al., 2008 Guillot et al., 2000
	2370-2389	Antisense	TCATTACACGCTGACACAAA	
Gior 2227 F Gior 3193 R	2220-2239	Sense	AGCTGCGTGTGTGTGTACC	Παρούσα εργασία
	3167-3186	Antisense	TCACATGCTGGGCTTAAAA	
EUG3a	2934-2953	Sense	TGGCAAACCTCCWCCAACCC	Caro et al. (2001)
EUG3b	2934-2953	Sense	TGGCAAACATCTTCMAATCC	
EUG3c	2934-2953	Sense	TGGCAGACTTCAACHAACCC	
EUC2	4401-4421	Antisense	TTTGCACTTGAACGTATGTA	
EUC2a	4416-4435	Antisense	GGTTCAATACGGCATTTG	
EUC2b	4418-4435	Antisense	GGTTCAATACGGTGTGTTGCT	

CHR1	4273-4297	Sense	CNTCHCARAGTGAYCARGARCARYT	Kottaridi et al 2007
CHR2	5050-5072	Antisense	GTAYACYGGTGGWCCYTGRAAKA	
Gior 4878 F	4871-4888	Sense	AACATGCGATGAGGAGTG	Παρούσα εργασία
Gior 6018 R	5992-6011	Antisense	TTTGGTCTTGCTAGGGGTGT	
5850F	5826-5848	Sense	CAGTGYGGIGGIGTICTCATGTC	Lukashev et al., 2003
6500R	6495-6520	Antisense	AGRTTGCCAAAYGTYTGCTCATTGC	
CHR5	6473-6495	Sense	ATCCAGYTTGAAYGAYTCIGIRG	Kyriakopoulou et al., 2012
CHR6	7220-7243	Antisense	GAAYTCYTCRTAYTCKTGCTCYCC	

Πίνακας 3: Εκκινητικά μόρια

4.Αντίστροφη μεταγραφική (RT-PCR)

Μετά την απομόνωση του RNA, το επόμενο βήμα είναι η μετατροπή του σε συμπληρωματικό DNA (cDNA), το οποίο θα χρησιμοποιηθεί στην συνέχεια ως πρότυπο (template) για να ενισχυθεί με την διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται ως γνωστόν, το ένζυμο RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, το οποίο χρησιμοποιώντας ως πρότυπο μόρια RNA συνθέτει τα συμπληρωματικά τους μόρια DNA. Αναλυτικότερα η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης τύπου erppendorf, όγκου 500μl, αναμείξαμε:

α) 5 μl μείγματος RNA

β) 7 μl μείγματος M1 αποτελούμενο από: 5μl ddH₂O , 1μl μείγματος τυχαίων εκκινητών HEPTAN 100 pmol/μl και 1 μl dNTPs 40 mM

Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε και επωάστηκε στους 65⁰C για 5 λεπτά. Αμέσως μετά καταψύχθηκε και προστέθηκε το δεύτερο μείγμα M2 αποτελούμενο από:

α) 1μl ddH₂O

β) 4μl first strand buffer (5x)

γ) 2μl DDT 0,1M

δ) 0,5μl RNase out 20u/μl

ε) 0,5 μl ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης - Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV RT, Invitrogen) 100 u/μl.

Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε και επωάστηκε στους 65⁰ C για 5 λεπτά. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την επώαση του μείγματος στους 25, 37 και 70⁰ C για 10, 50 και 15 λεπτά αντίστοιχα.

Η διαδικασία που περιγράψαμε πιο πάνω εκτελέστηκε πριν την PCR για όλα τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήσαμε, εκτός από τα εκκινητικά μόρια EUC2-EUG3a,b,c πριν την εφαρμογή των οποίων πραγματοποιήσαμε την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, χρησιμοποιώντας τα αντικωδικά εκκινητικά μόρια EUC2a και EUC2b σε συγκέντρωση 10pmol και σε θερμοκρασία 42°C.

5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) έχουμε την δυνατότητα να πολλαπλασιάσουμε έως και δισεκατομμύρια φορές ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA, μέσα σε 1-2 ώρες. Η τεχνική της PCR που ακολουθήσαμε περιγράφεται αναλυτικά πιο κάτω.

Σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης τύπου errendorf όγκου 200μl δημιουργήσαμε το μείγμα της PCR, συνολικού όγκου 50μl, αποτελούμενο από τα παρακάτω συστατικά:

A) 34,5μl ddH₂O

B) 0,5μl Paq DNA πολυμεράση συγκέντρωσης 5u/μl (Paq 5000 DNA, Stratagene)

Γ) 5μl Paq buffer (10x)

Δ) 5μl μείγματος dNTPs (10mM)

E) 2μl εκκινητών (1μl κωδικού και 1μl αντικωδικού), συγκέντρωσης 50pmol

ΣΤ) 3μl cDNA

Στην συνέχεια φυγοκεντρήσαμε τα δείγματα και τα τοποθετήσαμε στον θερμοκυκλοποιητή. Τα μηχανήματα αυτά εκτελούν αυτοματοποιημένα τα στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, τα οποία είναι τα εξής:

1) στάδιο αποδιάταξης: στους 95°C για 20sec

2) στάδιο υβριδοποίησης: στους 35-55° C για 15 έως 30 δευτερόλεπτα ανάλογα με τους εκκινητές. Στο στάδιο αυτό τόσο η θερμοκρασία υβριδοποίησης όσο και ο χρόνος εξαρτώνται από την ομολογία των εκκινητών έτσι ώστε να αποφύγουμε την παραγωγή παραπροϊόντων.

3) στάδιο επιμήκυνσης. Το στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 72°C και ο χρόνος επώασης κυμάνθηκε από 15sec έως 1 λεπτό.

Ειδικά για τα ζεύγη των εκκινητών που σχεδιάστηκαν για την παρούσα μελέτη (Gior1051F-Gior1778R, Gior2227F-Gior3193R, Gior4878F-Gior6018R) πραγματοποιήθηκαν 40 κύκλοι με τις παρακάτω συνθήκες για κάθε στάδιο:

- 1) αποδιάταξη: 95°C, 20sec
- 2)υβριδοποίηση:52°C, 20sec
- 3)επιμήκυνση: 72°C, 20, 25 ,30sec αντίστοιχα

6.Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Μετά από κάθε πείραμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), πραγματοποιήσαμε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης. Αναλυτικότερα σε κωνική φιάλη που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (Tris boric acid-EDTA) όγκου 60ml, προσθέσαμε 1,2γρ. αγαρόζης έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 2%w/v. Το μείγμα που προέκυψε αναδεύτηκε και θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων και σε θερμοκρασία 40°C για 1 λεπτό, έτσι ώστε να λιώσει η αγαρόζη. Προσθέσαμε επιπλέον 100 μg/ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) συγκέντρωσης 1mg/ml. Πρόκειται για μία ετεροκυκλική αρωματική φθορίζουσα ουσία, η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων και φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 290nm. Το μείγμα που προέκυψε τοποθετήθηκε στην συνέχεια σε βάση ηλεκτροφόρησης και αφέθηκε έτσι ώστε να πήξει η αγαρόζη.

Αφού προετοιμάσαμε το πήκτωμα, αναμείξαμε στις θέσεις εκκίνησης 10μl από το προϊόν της PCR και 2μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης) , ενώ παράλληλα χρησιμοποιήσαμε μάρτυρα MB (Invitrogen ladder of 100bp). Τέλος εφαρμόσαμε ηλεκτρική τάση στα άκρα της θήκης ηλεκτροφόρησης έντασης 120volts για χρονικό διάστημα μιας ώρας. Μετά το τέλος της διαδικασίας οπτικοποιήσαμε το αποτέλεσμα του πειράματος με υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφίσαμε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή.

7. Καθαρισμός και αλληλούχηση των προϊόντων της PCR

Μετά το τέλος του πειράματος της ηλεκτροφόρησης και αφού επιβεβαιώσαμε ότι πετύχαμε να ενισχύσουμε την περιοχή που επιθυμούσαμε, πραγματοποιήσαμε την διαδικασία ηλεκτροφόρησης για το υπόλοιπο προϊόν της PCR (40μl). Στην συνέχεια κόψαμε τις ζώνες που αντιστοιχούσαν στα προϊόντα της αντίδρασης και τις τοποθετήσαμε σε σωληνάριο τύπου erppendorf. Στην συνέχεια καθαρίσαμε τις ενισχυμένες αλληλουχίες. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με την χρήση των Nucleospin Gel και PCR CLEAN UP (Macherey-Nagel, Deutschland). Η αλληλούχηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών κατά Sanger, πραγματοποιήθηκε από την εταιρία CeMIA SA (Λάρισα, Ελλάδα).

8.Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Μετά την αλληλούχηση του στελέχους Gior από την εταιρία CeMIA SA, έγινε η παραλαβή της με την μορφή χρωματογραφήματος και η απαραίτητη διόρθωσή της. Η διορθωμένη πλέον σχεδόν πλήρης αλληλουχία του στελέχους Gior (από το νουκλεοτίδιο 1 έως και το νουκλεοτίδιο 7180) κατατέθηκε στην Τράπεζα δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών GenBank, με αριθμό καταχώρησης KY131965.

Στην συνέχεια προχωρήσαμε στην μελέτη και την σύγκριση της αλληλουχίας μας με προγράμματα βιοπληροφορικής. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε τα ακόλουθα προγράμματα:

1) BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, πρόκειται για έναν αλγόριθμο ο οποίος επιτρέπει την σύγκριση πρωτοταγών δομών (αμινοξικές, νουκλεοτιδικές αλληλουχίες). Με το εργαλείο αυτό μπορούμε να συγκρίνουμε μία αλληλουχία αναφοράς με όλες τις αλληλουχίες που βρίσκονται καταχωρημένες σε μία βάση δεδομένων και να αναγνωρίσει εκείνες που παρουσιάζουν ομοιότητες πάνω από μία συγκεκριμένη ουδό (όριο), που στην γλώσσα του αλγορίθμου BLAST, εκφράζεται με την μεταβλητή e-value. Ο αλγόριθμος διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο και συγκεκριμένα στον ιστότοπο του NCBI, <http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>

Αναλυτικότερα στην δική μας μελέτη ως αλληλουχίες αναφοράς χρησιμοποιήσαμε τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της 5'UTR και της VP1 καψιδιακής πρωτεΐνης και σαν όριο χρησιμοποιήσαμε 1e-10, έτσι ώστε να βρούμε εκείνες τις αλληλουχίες από στελέχη E-30, που είναι καταχωρημένες στις βάσεις δεδομένων του NCBI .

3)ClustalW: Πρόκειται για αλγόριθμο με τον οποίο μπορούμε να κάνουμε πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών. Τα αποτελέσματα της ομολογίας χρησιμοποιούνται για φυλογενετική ανάλυση. Το πρόγραμμα αυτό μπορούμε να το βρούμε στον ιστότοπο του Ευρωπαϊκού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής (European Bioinformatics Institute-EBI), μέλους του Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (European Molecular Biology Laboratory-EMBL).

<http://www.ebi.ac.uk>

4) MEGA v6.06: (Molecular Evolutionary Genetics Analysis: Το λογισμικό αυτό χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων. Αναλυτικότερα εφαρμόζοντας τον αλγόριθμο ClustalW, στο παραπάνω λογισμικό πραγματοποιήθηκαν δύο πολλαπλές στοιχίσεις αλληλουχιών, μία για την 5' UTR και μία για την VP1 γενωμική περιοχή. Επιλέξαμε τις περιοχές εκείνες που είχαν επαρκές μήκος. Συγκεκριμένα για την 5'UTR χρησιμοποιήθηκε το τμήμα της αλληλουχίας από το νουκλεοτίδιο 148 έως το 498 και για την VP1 , από το 2614 έως το 2889, με βάση το πρότυπο στέλεχος των Echovirus 30 (E-30), που ονομάζεται στέλεχος Bastianni.

Η τελική επιλογή έγινε για τα στελέχη εκείνα που είχαν αλληλουχίες και στις δύο περιοχές και τα οποία ήταν 85 στο σύνολο. Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων έγινε με την μέθοδο της μέγιστης πιθανότητας και η αξιοπιστία του δέντρου επαληθεύτηκε με την μέθοδο bootstrapping. Η μέθοδος αυτή δείχνει πόσος φορές ένας κλάδος ξαναεμφανίζεται στο δέντρο μετά από την επανάληψη της διαδικασίας χρησιμοποιώντας ένα υποσύνολο των δεδομένων από το αρχικό σύνολο.

5) SimPlot (3.5) και T-RECs: Τα προγράμματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ανασυνδυασμών. Αναλυτικότερα για την μελέτη πιθανών ανασυνδυασμών χρησιμοποιήθηκαν οι διαθέσιμες ακολουθίες 62 στελεχών Echovirus 30. Χρησιμοποιήσαμε το τμήμα τις ακολουθίας που καλύπτει μερικώς την 5' UTR, VP4 και VP2 περιοχές του γονιδιώματος από το νουκλεοτίδιο 150, έως το νουκλεοτίδιο 1091, μήκους 946 νουκλεοτιδίων. Με εξαίρεση τα ανασυνδυασμένα στελέχη, όλες οι υπόλοιπες αλληλουχίες ομαδοποιήθηκαν έτσι ώστε η ανίχνευση πιθανών ανασυνδυασμών να μελετηθεί σε σχέση με τις ομάδες και υποομάδες με βάση τα φυλογενετικά δέντρα. Στον πίνακα-3 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα διάφορα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη ομοιότητας (Similarity Plot).

Στέλεχος	Έτος	Χώρα Προέλευσης	Αριθμός καταχώρησης	Ομάδα	Μέση απόσταση μεταξύ των στελεχών από το νουκλεοτίδιο 150-1091
Bastianni	1958	ΗΠΑ	AF162711	-	-
I4916net87	1987	Ολλανδία	DQ534205	d	0,0208
89T2090_ORF1	1989	Γαλλία	AJ133661		
91TLC_ORF1	1991	Γαλλία	AJ133662		
CF670-91	1991	Γαλλία	AM237021	e.C0 I	0,013
CF768-91	1991	Γαλλία	AM237022		
CF885-91	1991	Γαλλία	AM237036		
CF1046-91	1991	Γαλλία	AM237030		
CF647-92	1992	Γαλλία	AM237034		
CF1347-92	1992	Γαλλία	AM237031	e.C0 II	0,005
CF495-92	1992	Γαλλία	AM237023		
CF298-81	1981	Γαλλία	AM237021	-	-
C/Roma97	1997	Ιταλία	AJ295171	e.C1	0,0334
CF1350-94	1994	Γαλλία	AM237032		
CF1495-00	2000	Γαλλία	AM237029		
CF2191-01	2001	Γαλλία	AM237020		
CF51-96	1996	Γαλλία	AM237016		
CF594-96	1996	Γαλλία	AM237017		
CF613-96	1996	Γαλλία	AM237018		
CF746-98	1998	Γαλλία	AM237019		

CF783-94	1994	Γαλλία	AM237035		
ECV30/GX10/05	2010	Κίνα	JX854435	e.C1r	0,0269
Kor08-ECV30	2008	Νότια Κορέα	JN704615		
CF1270-97	1997	Γαλλία	AM237034	e.C2	0,0043
CF1448-97	1997	Γαλλία	AM237013		
CF1489-97	1997	Γαλλία	AM237014		
CF282-97	1997	Γαλλία	AM237011		
1167438	2006	Ελβετία	JN797614	-	-
1167438_phMC	2009	Ελβετία	JN797616	-	-
CF521-96	1996	Γαλλία	AM237003	f.C3	0,0191
CF753-00	2000	Γαλλία	AM237028		
CF1430-00	2000	Γαλλία	AM237007		
CF1609-00	2000	Γαλλία	AM237008		
CF1610-00	2000	Γαλλία	AM237009		
CF1830-00	2000	Γαλλία	AM237010		
CF526-96	1996	Γαλλία	AM237004		
CF552-00	2000	Γαλλία	AM237006		
EV30-8477-98	1998	Ρωσία	AY896767		
CF1319-02	2002	Γαλλία	AM237002	f.C4- f.C5	0,0241
CF1500801-05	2005	Γαλλία	AM237038		
CF1510801-05	2005	Γαλλία	AM237039		
CF1532-00	2000	Γαλλία	AM236994		
CF1570-02	2002	Γαλλία	AM237033		
CF1590401-05	2005	Γαλλία	AM237040		
CF1600771-05	2005	Γαλλία	AM237041		
CF1681-00	2000	Γαλλία	AM237026		
CF1797-01	2001	Γαλλία	AM236998		
CF1939-00	2000	Γαλλία	AM237027		
CF1982-00	2000	Γαλλία	AM236995		
CF2113-01	2001	Γαλλία	AM237000		
CF2249-01	2001	Γαλλία	AM237001		
CF680-01	2001	Γαλλία	AM236997		
CF2575-00	2000	Γαλλία	AM236996		
Gior	2001	Ελλάδα	KY131965		
CF1710981-05	2005	Γαλλία	AM237042		
CF1851-01	2001	Γαλλία	AM236999		
TW/2513/01	2001	Ταϊβάν	EF066391	g	0,012
TW/3182/01	2001	Ταϊβάν	EF066392		
E30SD2010CHN	2010	Κίνα	JX976773	h	0,0376
Echo30/Zhejiang/17/03/CSF	2003	Κίνα	DQ246620		
FDJS03_84_	2003	Κίνα	AY948442		
EV30-14125-00	2000	Ουκρανία	AY896766		

Πίνακας 3: στελέχη και οι ομάδες τους που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη ομοιότητας (SimPlot)

ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:

1: Φυλογενετικό δέντρο με βάση την αλληλουχία της VP1

Με βάση τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της VP1 καψιδιακής πρωτεΐνης κατασκευάσαμε το φυλογενετικό δέντρο των εντεροϊών E30, το οποίο φαίνεται στο σχήμα 5.

Τα 85 στελέχη που μελετήσαμε ταξινομούνται σε 7 γενεαλογικές ομάδες (lineages)-ομάδες από c έως i. Η ομάδα e χωρίστηκε επιπλέον σε 3 υποομάδες (e.C0-e.C2) και οι ομάδες f επίσης σε 3 (f.C3-f.C5).

Με βάση την μελέτη μας το στέλεχος Gior τοποθετήθηκε στην υποομάδα f.C4, μαζί με στελέχη που απομονώθηκαν κατά την διάρκεια επιδημικών εξάρσεων στη Γαλλία μεταξύ των ετών 2000-1.

Το πρότυπο στέλεχος E30 Bastiani , που απομονώθηκε στις ΗΠΑ το 1958, ανήκει στην ομάδα C. Στην ομάδα d ταξινομούνται ένα στέλεχος από την Ολλανδία το 1987 (14916net87) και 2 στελέχη από την Γαλλία που απομονώθηκαν τα έτη 1989, 1991(89T2090 και 91TLC).

Η ομάδα e, όπως έχουμε αναφέρει, χωρίζεται σε τρεις υποομάδες. Η υποομάδα e.C0 περιλαμβάνει διάφορα στελέχη από την Γαλλία που απομονώθηκαν τα έτη 1991-2, ένα στέλεχος που απομονώθηκε το 1981 και ένα στέλεχος από την Ιταλία (1999). Η υποομάδα e.C1 περιλαμβάνει διάφορα στελέχη που απομονώθηκαν κατά την διάρκεια επιδημιών από διάφορες ευρωπαϊκές χώρες (Γαλλία, Ιταλία) αλλά και την Νότια Κορέα και την Κίνα, καθώς επίσης και τρία ελληνικά στελέχη (Kal, Kar, Han), τα οποία απομονώθηκαν κατά την διάρκεια της ίδιας επιδημίας με το στέλεχος Gior το 2001. Τέλος η υποομάδα e.C2 περιλαμβάνει διάφορα στελέχη από την Γαλλία (1997) και την Αυστραλία (2006-7).

Η ομάδα f, όπως αναφέραμε, χωρίζεται σε τρεις υποομάδες. Η f.C3 περιλαμβάνει στελέχη κυρίως από την Γαλλία (1996,2000), αλλά και ένα από την Ιταλία (1997) και ένα από την Ρωσία(1998). Η f.C4 αποτελείται από στελέχη από την από την Γαλλία (2000-1) και το στέλεχος Gior από την Ελλάδα και τέλος η υποομάδα f.C5 σχηματίζεται κυρίως από γαλλικά στελέχη (2005).

Τέλος δύο στελέχη από την Ταιβάν που απομονώθηκαν το 2001 (TW/2513/01, TW/3182/01) σχηματίζουν την υποομάδα g, τρία κινεζικά στελέχη, τα οποία απομονώθηκαν το 2003 και το 2010 και ένα από την Ουκρανία την αποτελούν ομάδα h και δύο στελέχη που απομονώθηκαν από την Ελβετία το 2006 και το 2009 (1167438, 1167438_rhMC) αποτελούν την ομάδα i.

Επεξήγηση σχήματος 5 (επόμενη σελίδα) : Φυλογενετικό δέντρο με βάση την αλληλουχία της VP1

Λευκός κύκλος :ομάδα c,

μπλε τρίγωνο: ομάδα e.C1,

μπλε κύκλος: ομάδα e.C0,

κόκκινο τετράγωνο: ομάδα f.C4,

τιρκουάζ κύκλος: ομάδα g,

κίτρινος κύκλος : ομάδα i

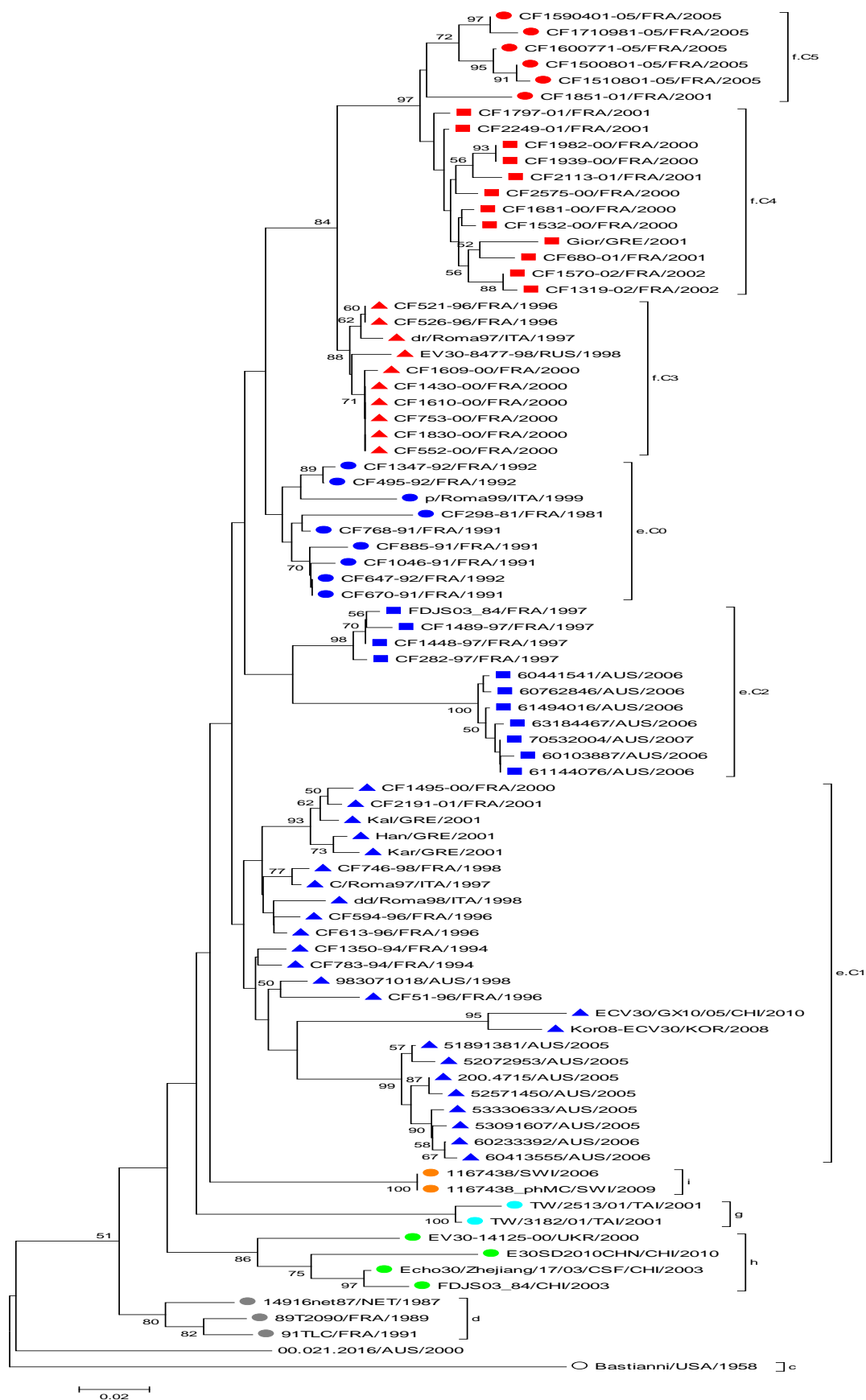
γκρι κύκλος: ομάδα d,

μπλε τετράγωνο: ομάδα e.C2,

κόκκινο τρίγωνο: ομάδα f.C3,

κόκκινος κύκλος :ομάδα f.C5,

πράσινος κύκλος: ομάδα h,



Σχήμα 5: Γενεαλογικό δέντρο της VP1.

2.Φυλογενετικό δέντρο με βάση την αλληλουχία της 5' UTR

Το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με βάση την ομολογία των στελεχών στην 5' αμετάφραστη περιοχή (5'UTR) φαίνεται στο σχήμα 6.

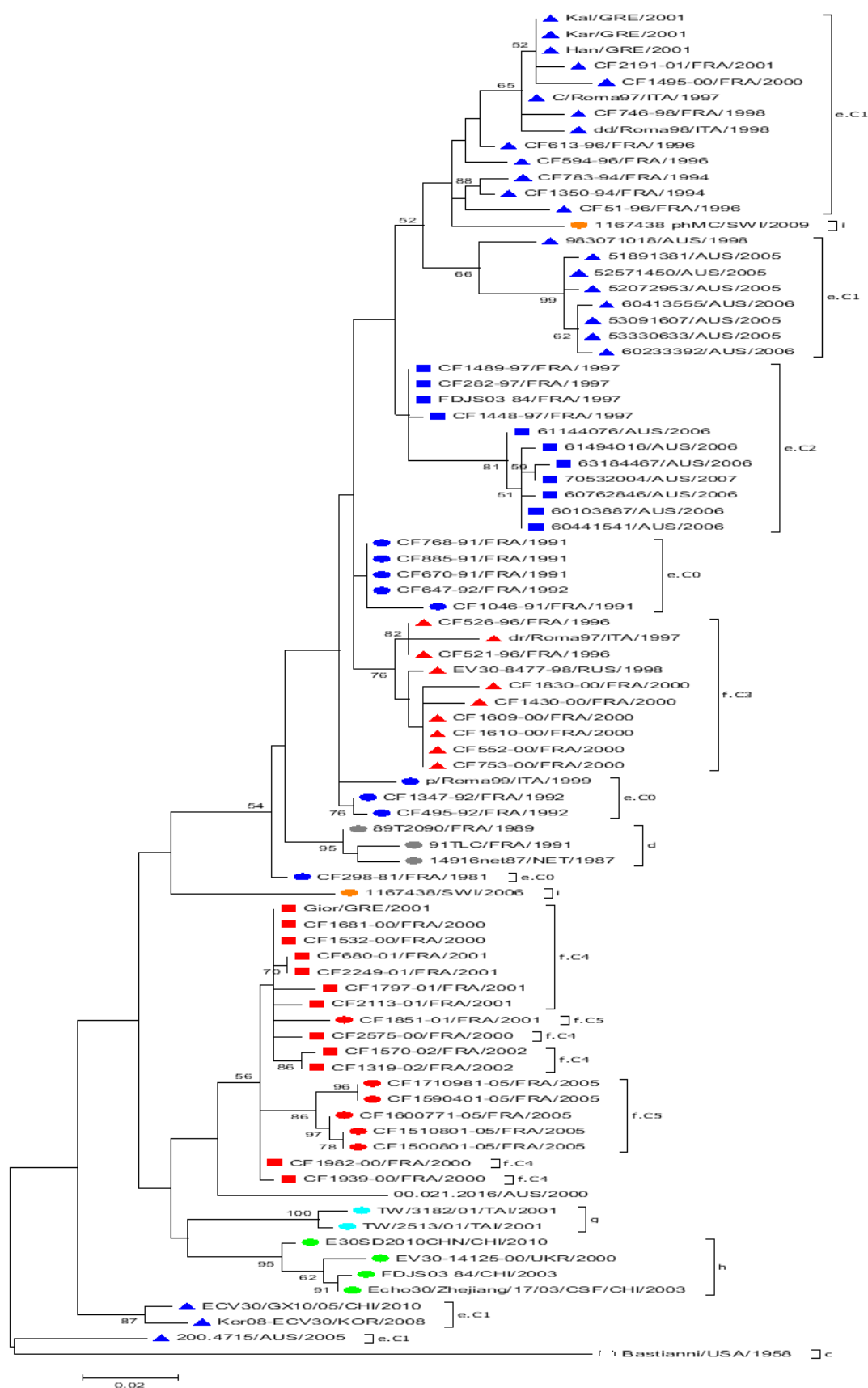
Στο δέντρο αυτό η πλειοψηφία των στελεχών ομαδοποιούνται στις ομάδες και υποομάδες που καθορίστηκαν με βάση την φυλογενετική ανάλυση της VP1 καψιδιακής πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά υπάρχουν κάποιες διαφορές ως προς την ομαδοποίηση των ομάδων και των υποομάδων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσής μας, οι ορότυποι που εξετάσαμε σχηματίζουν τρεις μεγάλες συστοιχίες.

Αναλυτικότερα οι υποομάδες e.C0, e.C1, e.C2, f.C3 και η γενεαλογική ομάδα d σχηματίζουν την μία από αυτές. Η δεύτερη συστοιχία σχηματίζεται από τις γενεαλογικές υποομάδες f.C4, f.C5, και από τις ομάδες g και h. Τέλος τρία στελέχη της υποομάδας e.C1, τα δύο στελέχη που απομονώθηκαν στην Νότια Κορέα (Kor08-ECV30 και ECV30/GX10/05) και το στέλεχος 200.4713, διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα στελέχη και σχηματίζουν ξεχωριστή ομάδα (e.C1r).

Μία ακόμα διαφορά είναι ότι τα 2 στελέχη που απομονώθηκαν στην Ελβετία (1167438, 1167438_rhMC) και εμφανίζουν 100% ομολογία στην VP1 πρωτεΐνη, αποκλίνουν στην 5'UTR (89% ομολογία στην περιοχή αυτή). Επίσης οι υποομάδες f.C4 και f.C5 έχουν αποκλίνει από την υποομάδα f.C3. Τέλος η υποομάδα e.C0 χωρίζεται σε τρεις ομάδες. Η πρώτη περιλαμβάνει στελέχη που απομονώθηκαν από την Γαλλία το 1991 (e.C0I), η δεύτερη τα στελέχη CF495-92 και CF134792 που απομονώθηκαν στην Γαλλία το 1992 και ένα ιταλικό στέλεχος, το p/Roma99 και αποτελούν την υποομάδα e.C0II και η τρίτη ομάδα αποτελείται από το στέλεχος CF298-81, το οποίο απομονώθηκε από την Γαλλία το 1981.

Επεξήγηση σχήματος 6-επόμενη σελίδα (τα σχήματα και τα χρώματα αντιστοιχούν σε αυτά του σχήματος 5-δηλ. στο γενεαλογικό δέντρο με βάση την VP1).

Λευκός κύκλος :ομάδα c, γκρι κύκλος d, μπλε τρίγωνο e.C1, μπλε τετράγωνο e.C2, μπλε κύκλος e.C0, κόκκινο τρίγωνο f.C3, κόκκινο τετράγωνο f.C4, κόκκινος κύκλος f.C5, τρκουάζ κύκλος g, πράσινος κύκλος h, κίτρινος κύκλος i.



Σχήμα 6: Γενεαλογικό δέντρο με βάση την 5' UTR

3.Ανίχνευση Ανασυνδυασμών.

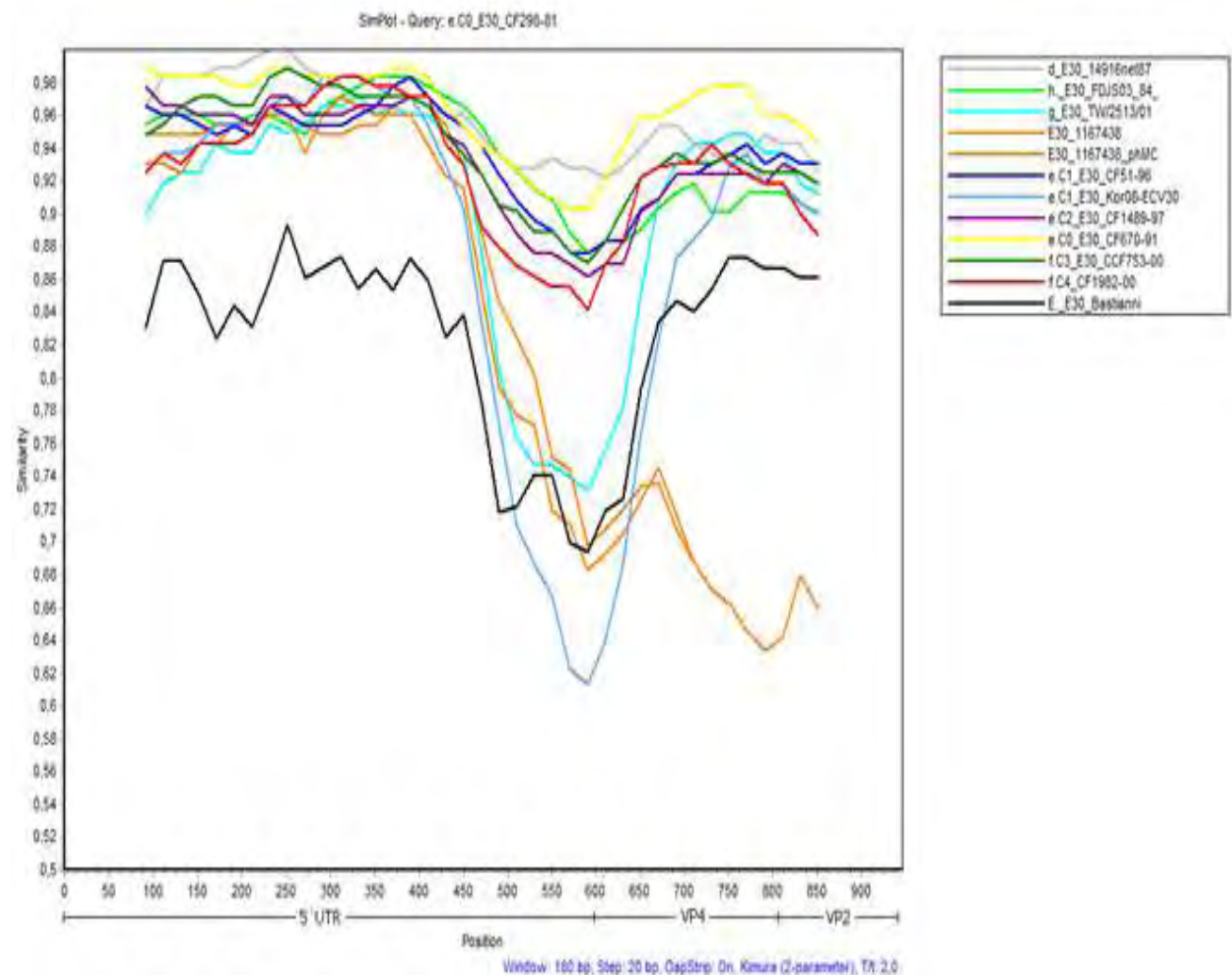
Στις παραπάνω δύο παραγράφους παρουσιάσαμε τις ασυμβατότητες μεταξύ των φυλογενετικών δέντρων που κατασκευάσαμε με βάση την ομολογία των στελεχών των εντεροϊών στην VP1 καψιδιακή πρωτεΐνη και την 5'UTR. Οι παραπάνω ασυμβατότητες αναλύθηκαν περαιτέρω με ανάλυση σχεδίασης ομοιότητας (Similarity plot Analysis) για την ανίχνευση γεγονότων ανασυνδυασμού. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκαν 62 αλληλουχίες εντεροϊών που έχουν καταχωρηθεί στην GenBank μήκους 946 νουκλεοτιδίων. Το μήκος αυτό καλύπτει μερικώς την 5' αμετάφραστη περιοχή (5'UTR) και τις καψιδιακές πρωτεΐνες VP4 και VP2. Αλληλουχίες ομοφωνίας Echo ιών E30 από κάθε γενεαλογική ομάδα και υποομάδα ομαδοποιήθηκαν και για κάθε ομάδα ορίστηκε ένας αντιπρόσωπος. Τα στελέχη, οι ομάδες και οι υποομάδες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στην πίνακα της σελίδας 39-41. Στην συνέχεια αναγράφονται οι αντιπρόσωποι κάθε φυλογενετικής ομάδας καθώς και τα χρώματα με τα οποία αντιπροσωπεύονται στην ανάλυση SimPlot

Αναλυτικότερα για την ομάδα d, ως αντιπροσωπευτικό στέλεχος ορίστηκε το 1491net87 (Ολλανδία) με γκρι χρώμα, για την ομάδα e.C0I το CF670-91 (Γαλλία) με κίτρινο χρώμα, για την ομάδα e.C0II το CF1347-92 (Γαλλία), για την ομάδα e.C1 o CF51-96 (Ιταλία) με μπλε χρώμα, για την ομάδα e.C1(r) το στέλεχος kor08-ECV30 (Ν.Κορέα) με γαλάζιο χρώμα, για την ομάδα e.C2 το CF1489-97 (Γαλλία) με μωβ χρώμα, για την ομάδα f.C3 το στέλεχος CF753-00 (Γαλλία) με πράσινο χρώμα, για την ομάδα f.C4-f.C5 το στέλεχος CF1982-00 (Γαλλία) με κόκκινο χρώμα, για την ομάδα d το TW/2513/01 (Ταϊβάν) με τρκουάζ χρώμα και τέλος για την ομάδα h, ως αντιπρόσωπος ορίστηκε το στέλεχος FDJS03_84_9_ (Κίνα) με ανοικτό πράσινο χρώμα. Το στέλεχος Bastianni αντιπροσωπεύεται με μαύρο χρώμα στην ανάλυση SimPlot.

Στην συνέχεια κάθε ομάδα συγκρίθηκε με όλες τις άλλες ομάδες. Οι ασυμβατότητες που παρατηρούνται μεταξύ των δύο φυλογενετικών δέντρων επιβεβαιώθηκαν με την **ανάλυση ομοιότητας (Similarity plot analysis)**.

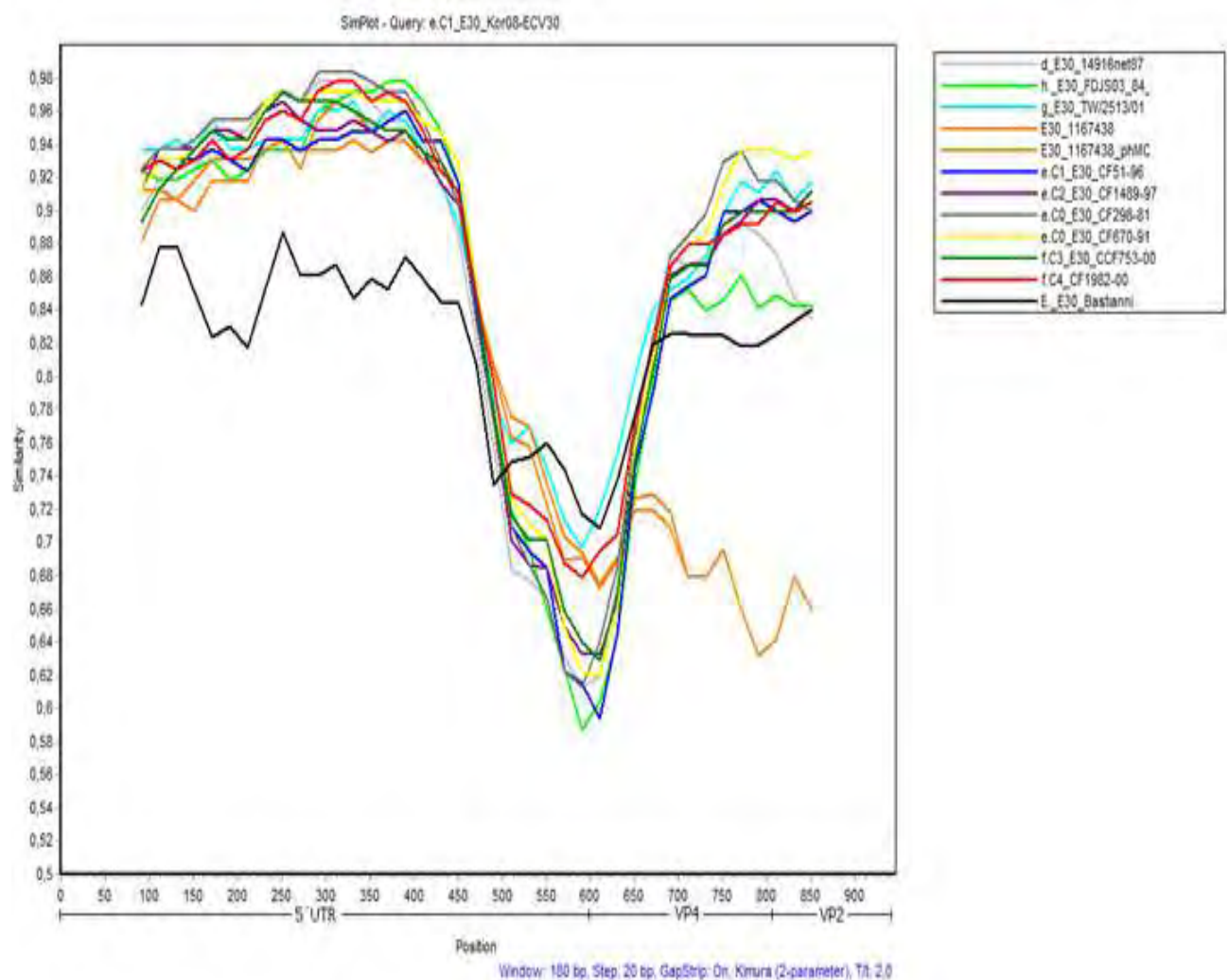
Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται οι ασυμβατότητες για τα διάφορα στελέχη και στις ομάδες και υποομάδες στις οποίες ανήκουν:

A) CF298-81, (e.C0)



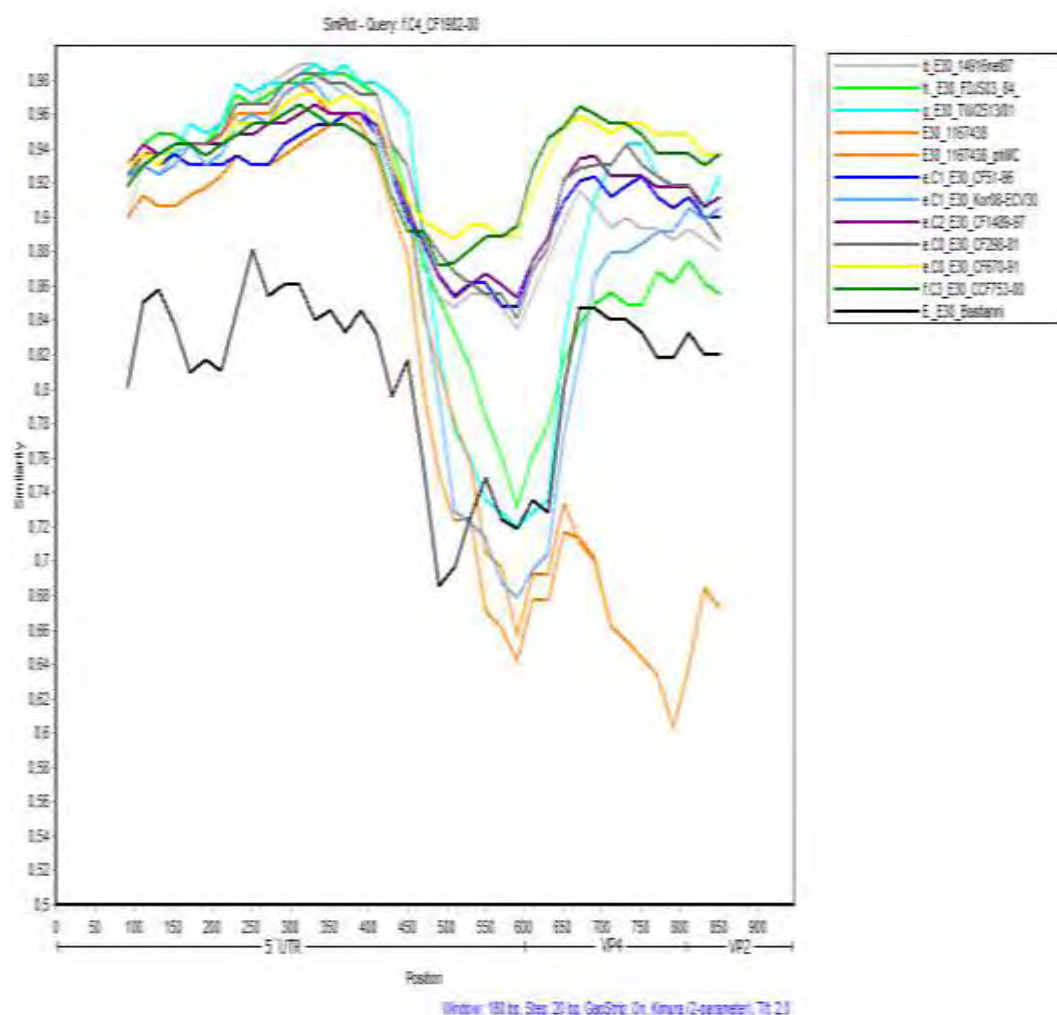
Εικόνα-4: SimPlot της ομάδας e.C0: παρατηρείται μία βαθιά «βουτιά», η οποία ξεκινάει από την 5' UTR, που σημαίνει μείωση της ομοιότητας της αλληλουχίας αναφοράς στην συγκεκριμένη περιοχή με τις υπό εξέταση αλληλουχίες των υπολοίπων στελεχών E-30. Αυτή η απότομη βουτιά θα μπορούσε να οφείλεται σε φαινόμενο ανασυνδυασμού. Τα διαφορετικά χρώματα δείχνουν τις ομάδες που προσδιορίσαμε με βάση την φυλογενετική ανάλυση (5' UTR) και τον αντίστοιχο αντιπρόσωπό τους.

B) EV30/GX10/05, Kor08-ev30, 200.4715, (e.C1)



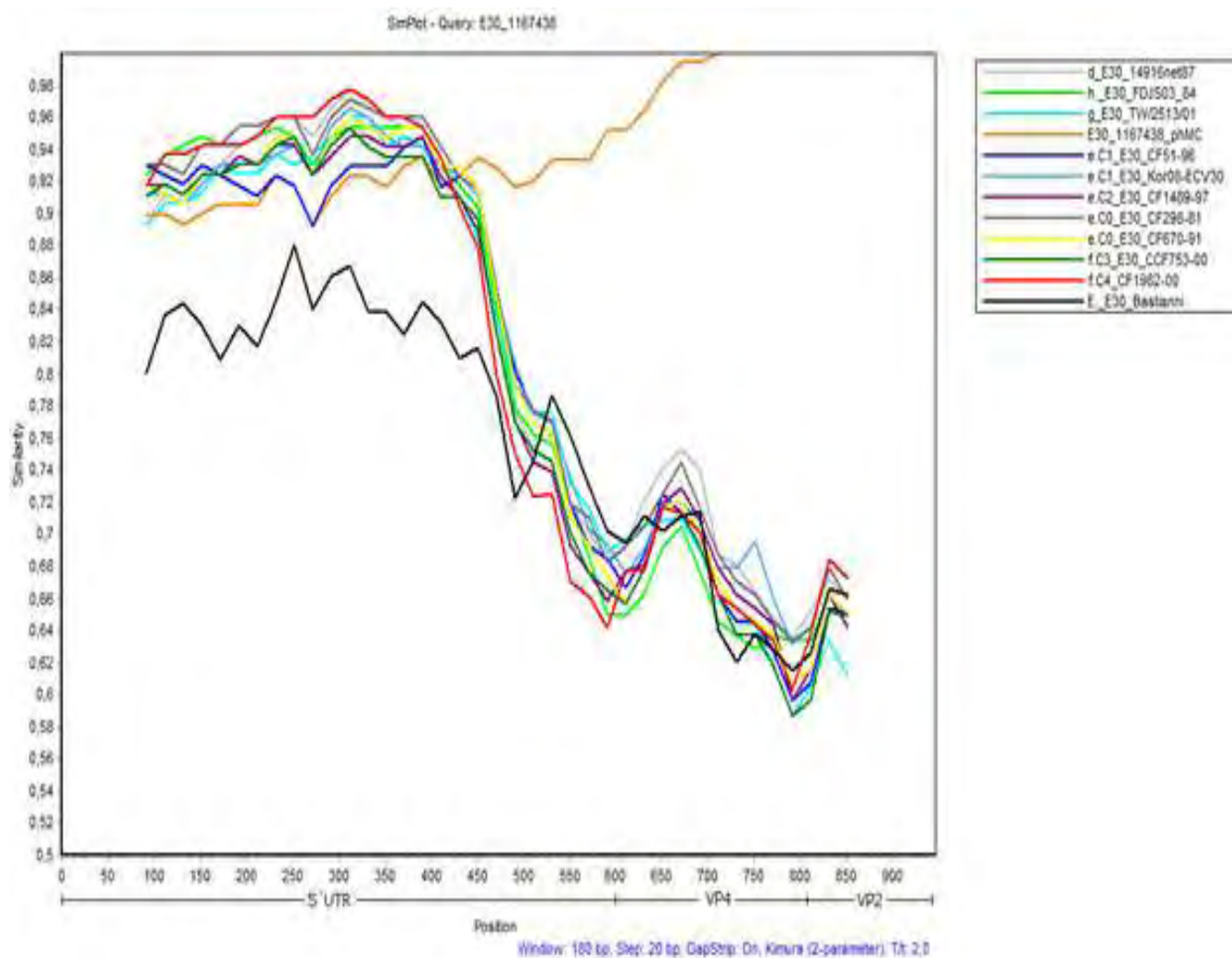
Εικόνα-5: SimPlot της ομάδας e.C1: Ομοίως παρατηρούμε μια βαθιά «βουτιά» ανάμεσα στις αλληλουχίες αναφοράς με τις αλληλουχίες που συγκρίνουμε, που σημαίνει μια σημαντική μείωση στην ομοιότητά τους. Η «βουτιά» ξεκινάει στην 5' UTR και καταλήγει στην VP4 περιοχή. Με διαφορετικά χρώματα έχουμε ορίσει τις ομάδες που προσδιορίσαμε στην φυλογενετική ανάλυση (5' UTR) και τον αντίστοιχο αντιπρόσωπό τους.

Γ) f.C4 και f.C5



Εικόνα-6: SimPlot των ομάδων f.C4 και f.C5: Όπως και στις προηγούμενες εικόνες παρατηρούμε μια βαθιά «βουτιά» ανάμεσα στις αλληλουχίες αναφοράς με τις αλληλουχίες που συγκρίνουμε, η οποία ξεκινάει από την 5'UTR και επεκτείνεται στην VP4 περιοχή, που σημαίνει μια σημαντική μείωση στην ομοιότητά τους.

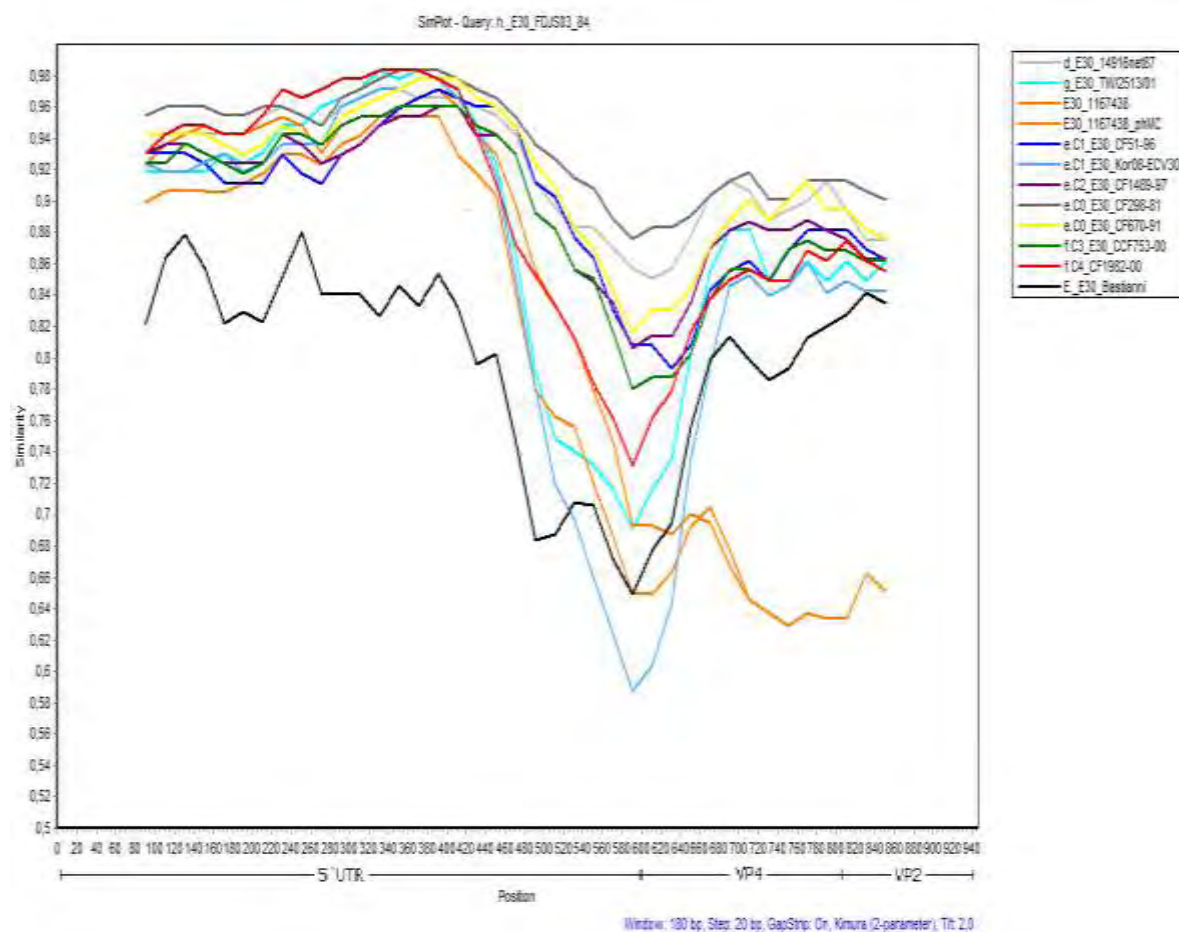
Δ) 1167438 (ομάδα i)



Εικόνα-7: Simplot ομάδας i: αναγνωρίζεται η μείωση της ομοιότητας της αλληλουχίας αναφοράς με τα υπόλοιπα στελέχη E-30

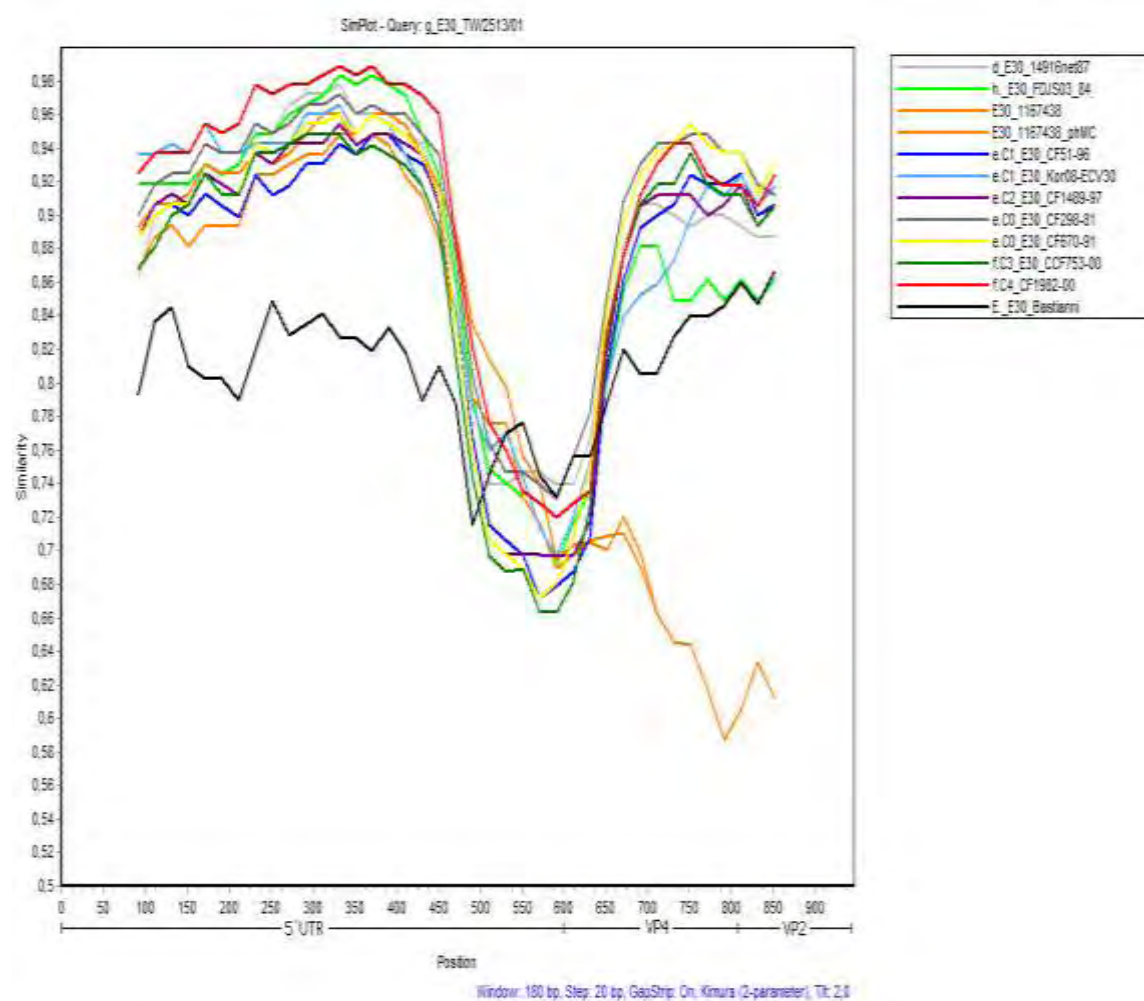
Εκτός από τις παραπάνω περιπτώσεις που αναφέραμε, παρατηρούμε δύο ακόμα **απότομες βουτιές** στην **μελέτη ομοιότητας (Similarity Plot)**. Η πρώτη αφορά το κινέζικο στέλεχος FDJS03_84_ το οποίο έχει ταξινομηθεί στην ομάδα h και η δεύτερη το κορεατικό στέλεχος TW/2513/01, το οποίο έχει ταξινομηθεί στην ομάδα g.

E)FDJS03_84_ (ομάδα h)



Εικόνα 8: SimPlot Της ομάδας h. Και στην περίπτωση αυτή μπορούμε να παρατηρήσουμε μία βαθιά βουτιά ανάμεσα στην αλληλουχία αναφοράς και στις αλληλουχίες σύγκρισης στην περιοχή 5'UTR-VP4.

ΣΤ)TW/2513/01 (ομάδα g)



Εικόνα 9: SimPlot της ομάδας ομάδας g. Και στην περίπτωση αυτή παρατηρούμε μια βαθιά βουτιά στην 5'UTR, η οποία επεκτείνεται στην VP4 γενωμική περιοχή.

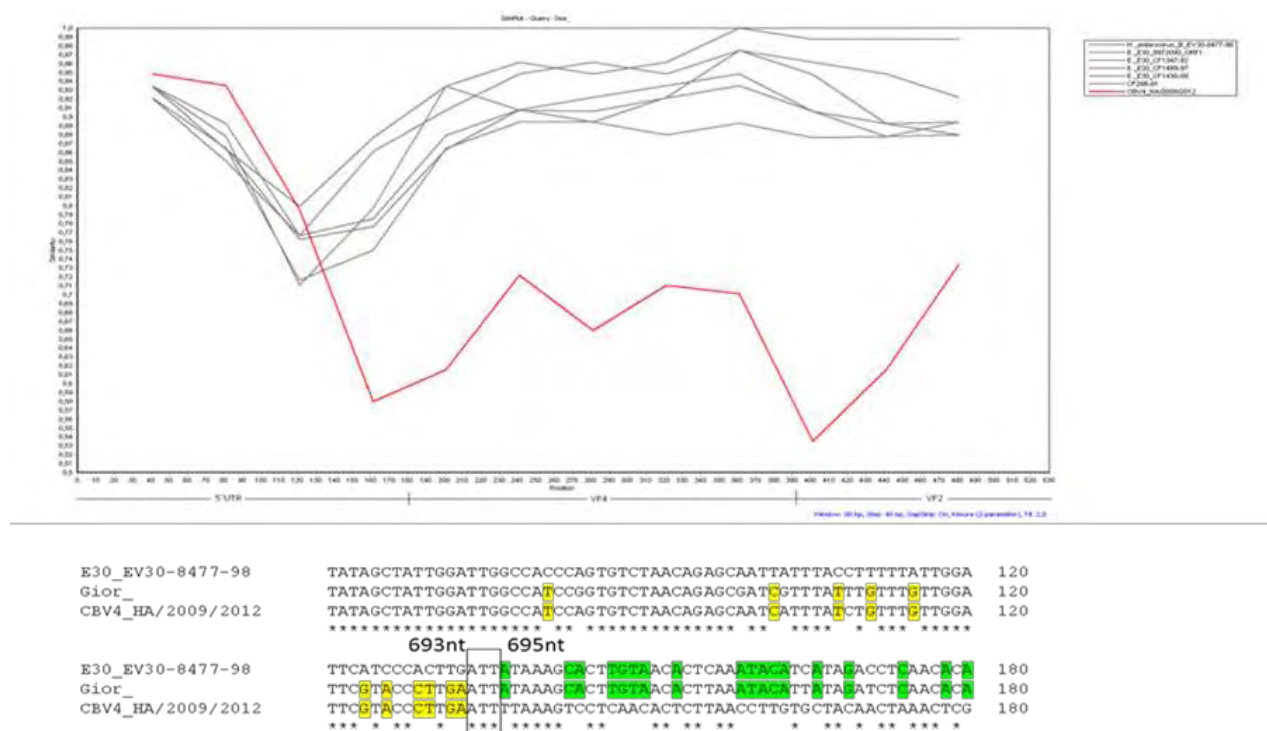
Οι παραπάνω «βουτιές» στην **μελέτη ομοιότητας** είναι ενδεικτικές ότι οι αντίστοιχες αυτές γενωμικές περιοχές μπορεί να προέρχονται από διαφορετικούς ορότυπους, να είναι δηλαδή αποτέλεσμα ανασυνδυασμού γενετικού υλικού.

Ένα δεύτερο συμπέρασμα που μπορούμε να βγάλουμε από την μελέτη των παραπάνω εικόνων είναι ότι οι αναντιστοιχίες αυτές αφορούν στην ίδια περιοχή του γονιδιώματος και συγκεκριμένα στο όριο 5'UTR-VP4, με το φαινόμενο του ανασυνδυασμού γενετικού υλικού να ξεκινάει από την 5'UTR και να καταλήγει στην VP4 καψιδιακή περιοχή.

4. Ανάλυση των ανασυνδυασμένων στελεχών

Η υπόθεση για φαινόμενα ανασυνδυασμού μεταξύ των διαφόρων ομάδων ή στελεχών Echo 30 ιών με διαφορετικούς ορότυπους επιβεβαιώθηκε με σύγκριση των στελεχών αυτών με καταχωρημένες αλληλουχίες στην GenBank μέσω ανάλυσης με τον αλγόριθμο BLAST. Βέβαια πρέπει να τονίσουμε ότι οι αλληλουχίες που αναγνωρίστηκαν μέσω σύγκρισης με τον αλγόριθμο BLAST ως πιθανοί δότες γενετικού υλικού δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για **μελέτη ομοφωνίας (Similarity plot)**, γιατί σε πολλές περιπτώσεις μόνο ένα μικρό τμήμα της αλληλουχίας του πιθανού δότη αποκαλύφθηκε. Για τον λόγο αυτό τα ανασυνδυασμένα στελέχη μελετήθηκαν ξεχωριστά, έτσι ώστε να έχουμε περισσότερες πληροφορίες για τους δότες του γενετικού υλικού. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης μας βγάλαμε τα εξής συμπεράσματα.

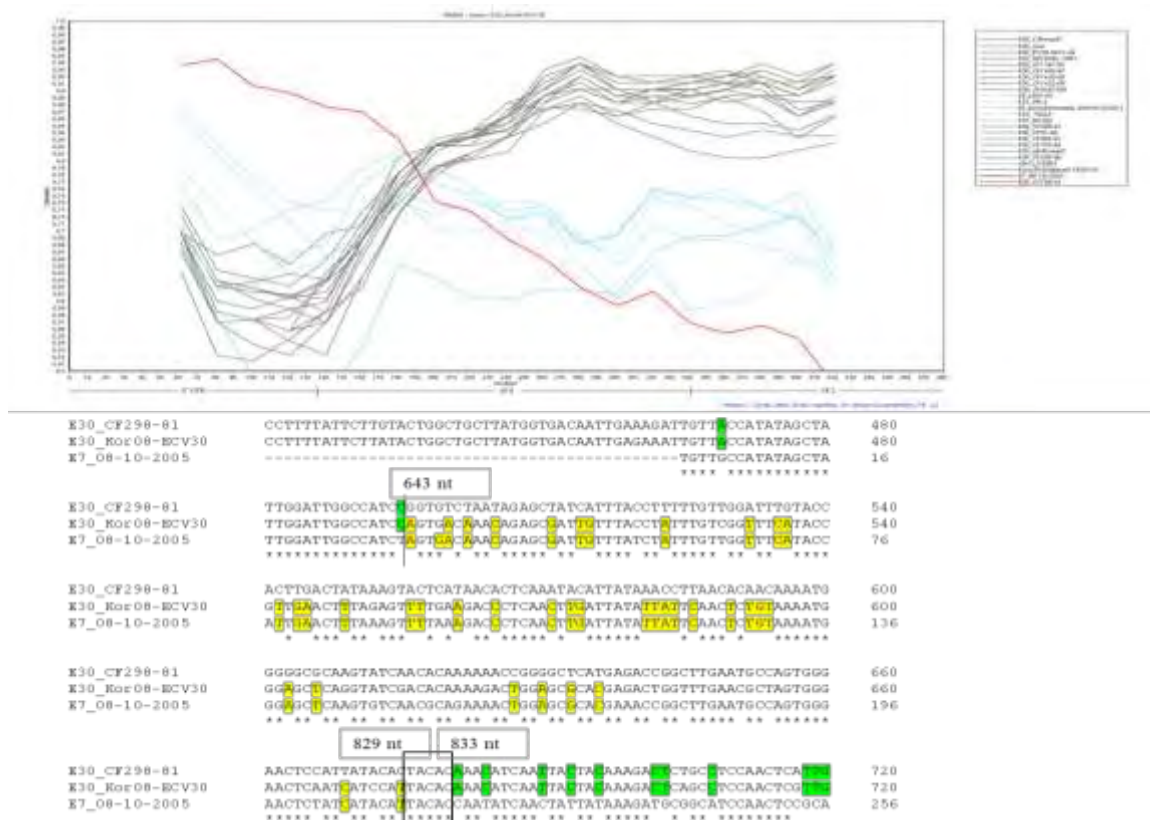
A) Στην περίπτωση των υποομάδων f.C4 και f.C5, ο πιθανός δότης φαίνεται ότι είναι ο ορότυπος του Coxsackie B, CV-B4, και πιο συγκεκριμένα το στέλεχος CVB4-THA/2009/2012 με αριθμό καταχώρησης στην GenBank KP062991.



Σχήμα 10: Στο επάνω κομμάτι της εικόνας φαίνεται η ανάλυση SimPlot. Οι γραμμές με γκρι χρώμα απεικονίζουν 6 αλληλουχίες E-30 στελεχών που αναγνωρίστηκαν με το BLAST ότι έχουν σημαντική ομοιότητα με το στέλεχος Gior. Με κόκκινη γραμμή απεικονίζεται το στέλεχος του ιού CV-B4. Στο κάτω μέρος της εικόνας απεικονίζεται το αποτέλεσμα του BLAST. Στην πρώτη γραμμή είναι η αλληλουχία ενός E30 ιού. Στην δεύτερη γραμμή η αλληλουχία του Gior, και στην τρίτη γραμμή ο CV-B4. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι ομοιότητες μεταξύ του Gior και του CV-B4 (ανασυνδυασμένο τμήμα) και με πράσινο μεταξύ του Gior και του E30 (μη ανασυνδυασμένο)

Όπως παρατηρούμαι στο σχήμα 10, η αλληλουχία αναφοράς (Gior) παρουσιάζει μεγάλη απόκλιση με τα υπόλοιπα E30 στελέχη και ομοιότητα με τον CV-B4. Στην περίπτωση αυτή ο ανασυνδυασμός εντοπίζεται αποκλειστικά στην 5' UTR. Λόγω του μικρού τμήματος της αλληλουχίας του δότη (CV-B4), μόνο το τέλος της ανασυνδυασμένης αλληλουχίας εντοπίστηκε στο σημείο 693.

Β) Για την ομάδα e.C1r, βρέθηκε ότι ο πιθανός δότης είναι ένα στέλεχος του Echovirus 7, και πιο συγκεκριμένα το στέλεχος E7_08-10-2005, με αριθμό καταχώρησης στην GenBank FJ796983.

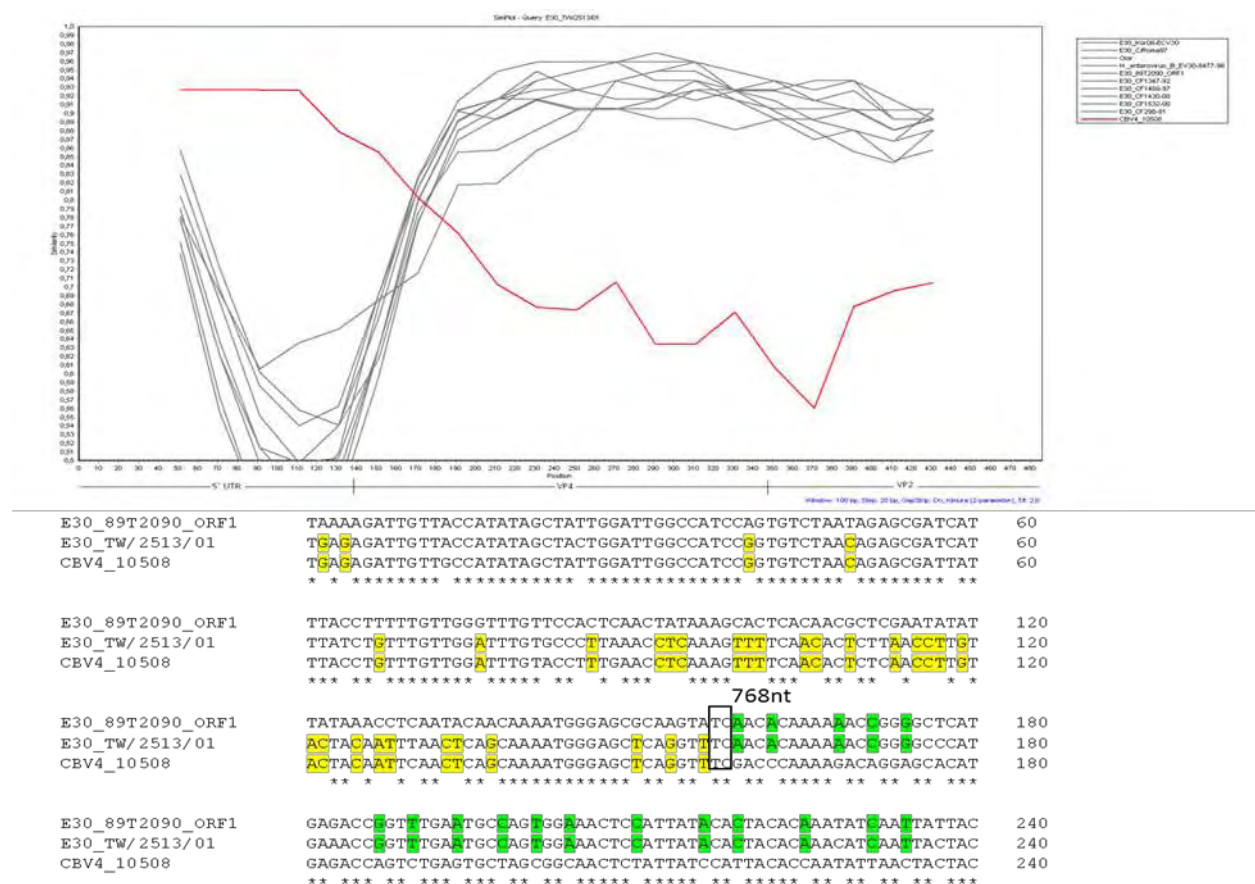


Εικόνα-11: Στο πάνω τμήμα της εικόνας απεικονίζεται η ανάλυση SimPlot. Οι γραμμές με γκρι χρώμα αντιπροσωπεύουν E30 ιούς. Οι γραμμές με γαλάζιο χρώμα άλλους ορότυπους (E-6 και E25), ενώ η γραμμή με κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύει τον πιθανό δότη E-7. Στο κάτω τμήμα απεικονίζεται το αποτέλεσμα του BLAST. Στην πρώτη γραμμή είναι η αλληλουχία ενός E-30 ιού, στην δεύτερη η αλληλουχία αναφοράς (Kor08) και στην τρίτη ο πιθανός δότης (E7). Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι ομοιότητες μεταξύ της αλληλουχίας αναφοράς και του δότη(E7), δηλαδή το ανασυνδυασμένο τμήμα και με πράσινο μεταξύ των E30 (μη ανασυνδυασμένο)

Όπως παρατηρούμε στην εικόνα-11, η ομάδα e.C1r (Kor08-ECV30), παρουσιάζει υψηλή ομοιότητα με τον πιθανό δότη E7, στην περιοχή από την 5' UTR έως την VP4

Ο ανασυνδυασμός εντοπίζεται στο τμήμα του γονιδιώματος από το νουκλεοτίδιο 643 στην 5' αμετάφραστη περιοχή, μέχρι το νουκλεοτίδιο 833 στην καψιδιακή πρωτεΐνη VP4.

Γ) Μία τρίτη περίπτωση ανασυνδυασμού παρατηρείται στην ομάδα g με αντιπροσωπευτικό στέλεχος TW/2513/01. Εδώ ο δότης προσδιορίστηκε το στέλεχος CV-B4, 10508.



Εικόνα-12: Στο πάνω τμήμα της εικόνας απεικονίζεται η ανάλυση SimPlot. Οι γραμμές με γκρι χρώμα αντιπροσωπεύουν E30 ιούς, ενώ η γραμμή με κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύει τον πιθανό δότη CV-B5. Στο κάτω τμήμα απεικονίζεται το αποτέλεσμα του BLAST. Στην πρώτη γραμμή είναι η αλληλουχία ενός E-30 ιού, στην δεύτερη η αλληλουχία αναφοράς (TW/2513/01) και στην τρίτη ο πιθανός δότης (CV-B4). Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι ομοιότητες μεταξύ της αλληλουχίας αναφοράς και του δότη (ανασυνδυασμένο τμήμα) και με πράσινο μεταξύ των E30 (μη ανασυνδυασμένο)

Η ομάδα αυτή φέρει γενετικό υλικό προερχόμενο πιθανώς από τον Coxsackie B 10 CB-V4 και πιο συγκεκριμένα από το στέλεχος 10508 GenBank με αριθμό καταχώρησης στην GenBank AF160118.

Και πάλι στην περίπτωση αυτή, λόγω του μικρού αριθμού της αλληλουχίας, απεικονίζεται μόνο το ένα άκρο της της στη θέση 768.

Δ) Στην περίπτωση της γενεαλογικής ομάδας i, φαίνεται ότι το αντιπροσωπευτικό στέλεχος 1167438 ανασυνδυάστηκε με στέλεχος του Coxsackie B1 ιού (CV-B1), αλλά λόγω της έλλειψης επαρκούς μήκους της αλληλουχίας ήταν αδύνατο να απεικονιστεί το φαινόμενο αυτό με την **ανάλυση ομοφωνίας (Similarity plot)**.

Ε)Τέλος ο δότης του γενετικού υλικού της ομάδας η δεν μπόρεσε να αναγνωριστεί με την σύγκριση με τον αλγόριθμο BLAST, με καμία καταχωρημένη αλληλουχία.

Μία ακόμα παρατήρηση είναι ότι σε όλες τις περιπτώσεις των ανασυνδυασμών που περιγράφηκαν το ακριβές σημείο του ανασυνδυασμού βρίσκεται στο 3' άκρο της 5' αμετάφραστης περιοχής, έξω από τις δευτεροταγείς δομές του «τριφυλλιού» και της εσωτερικής θέσης πρόσδεσης του ριβοσώματος (IRES).

Συζήτηση:

Όπως όλοι οι RNA ιοί, εμφανίζουν υψηλούς εξελικτικούς ρυθμούς. Αυτό συμβαίνει αφενός στους υψηλούς ρυθμούς μεταλλάξεων εξαιτίας της έλλειψης επιδιορθωτικής ικανότητας της πολυμεράσης που διαθέτουν και αφετέρου σε φαινόμενα ανασυνδυασμού. Ο ανασυνδυασμός αποτελεί ένα πολύ σημαντικό μηχανισμό εξέλιξης για τους εντεροϊούς (Kyriakopoulou et al.2010, Cambelas et al.,2011, Bailly J.L. et al,2011, Kyriakopoulou et al.,2015, Lukashev A.N,2005). Τόσο οι φυλογενετικές αναλύσεις, όσο και η αλληλούχηση του γονιδιώματος έχουν δείξει ότι τα φαινόμενα ανασυνδυασμού εντοπίζονται κυρίως στις λειτουργικές περιοχές του γονιδιώματος των εντεροϊών (Bessaud et al.,2011, Kyriakopoulou et al.,2010, Mirand et al.,2007). Το φαινόμενο του ανασυνδυασμού στις καψιδιακές περιοχές και ιδιαίτερα στην 5'αμετάφραστη περιοχή (5'UTR) θεωρούνταν πολύ σπάνια (Bouslama et al.,2007, Dedepsidis et al.,2008, Kyriakopoulou et al., 2006)

Παρόλα αυτά η ασυμβατότητα των φυλογενετικών δέντρων μεταξύ των περιοχών της 5' αμετάφραστης περιοχής (5'UTR) και της καψιδιακής περιοχής (Lukashev et al.,2005, Zhou et al.,2014) οδήγησε στην υπόθεση ότι η περιοχή αυτή μπορεί να αποτελεί ένα θερμό σημείο για φαινόμενα ανασυνδυασμού. Το φαινόμενο αυτό δεν είχε μελετηθεί εκτενώς. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, η ασυμβατότητα ανάμεσα στα φυλογενετικά δέντρα στην 5'UTR και την VP1 καψιδιακή πρωτεΐνη του στελέχους Gior, δημιούργησε υποψίες για φαινόμενο ανασυνδυασμού στην περιοχή αυτή (Kyriakopoulou et al.,2013).

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, η σύγκριση των φυλογενετικών δέντρων που κατασκευάσαμε με βάση την ομολογία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών στην 5' αμετάφραστη περιοχή και στην καψιδιακή πρωτεΐνη VP1 αποκάλυψε τις παρακάτω ανακολουθίες:

- 1)Τρία στελέχη της υποομάδας e.C1 (ECV30/GX10/05, Kor08-ECV30 και 200.4715) διαχωρίζονται από αυτήν και σχηματίζουν την υποομάδα e.C1r.
- 2) Η υποομάδα e.C0 διαχωρίστηκε σε τρεις επιμέρους υποομάδες
- 3) Τα δυο ελβετικά στελέχη της ομάδας i παρουσιάζουν αποκλίσεις στην ομολογία της 5' αμετάφραστης περιοχής.

4) Οι υποομάδες φαίνονται να αποκλίνουν από την f.C3 στο φυλογενετικό δέντρο της 5' αμετάφραστης περιοχής.

Οι ασυμφωνίες των φυλογενετικών δέντρων της 5' αμετάφραστης περιοχής και της VP1 γενωμικής περιοχής των εντεροϊών είχε δημιουργήσει υποψίες για φαινόμενα ανασυνδυασμού (Zhai et al., 2014). Η πρώτη ένδειξη για φαινόμενα ανασυνδυασμού μεταξύ διαφορετικών οροτύπων εντεροϊών προήλθε από την πλήρη αλληλούχηση ενός στελέχους του εμβολίου Sabin2 κατά της πολιομυελίτιδας, το οποίο φάνηκε ότι έχει ανασυνδυαστεί μερικώς στην 5' αμετάφραστη με έναν εντεροϊό της ομάδας C (Adu et al., 2007). Στην μελέτη μας περιγράφουμε για πρώτη φορά φαινόμενα ανασυνδυασμού στην 5' αμετάφραστη περιοχή σε κυκλοφορούντα στελέχη εντεροϊών της ομάδας B (EV-B).

Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύσαμε 6 περιπτώσεις ανασυνδυασμού στην περιοχή μεταξύ της 5'UTR και της VP4, παρά το γεγονός ότι αρχικά το φαινόμενο αυτό θεωρούνταν σπάνιο. Σύμφωνα με την μελέτη SimPlot, σχεδόν όλα τα περιστατικά ανασυνδυασμού εντοπίζονται στην ίδια περιοχή του γονιδιώματος. Αναλυτικότερα, το 5' άκρο του ανασυνδυασμένου τμήματος εντοπίζεται στην 5'UTR και το 3' άκρο στην αρχή της καψιδιακής περιοχής του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης και συγκεκριμένα στην VP4. Εξάιρεση αποτελεί μόνο το στέλεχος Gior, στο οποίο το ανασυνδυασμένο γενετικό υλικό βρίσκεται αποκλειστικά στην 5'UTR. Σε τρεις μάλιστα περιπτώσεις καταφέραμε να προσδιορίσουμε και τον δότη του γενετικού υλικού. Έτσι στην περίπτωση του στελέχους Gior (ομάδα f.C4-f.C5), ο δότης φαίνεται ότι είναι ένα στέλεχος CV-B4. Για το στέλεχος Kor08-ECV30 (ομάδα e.C1r), ο δότης φαίνεται ότι είναι ένας Echo ιός 7, και για το στέλεχος TW/2513/01, αντιπρόσωπο της ομάδας g και πάλι ένας CV-B4.

Η σημασία του ανασυνδυασμού στην συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος που μελετάμε στην μολυσματικότητα και εν γένει στην παθογένεια των εντεροϊών δεν έχει γίνει ακόμα πλήρως κατανοητή. Υπάρχουν πάντως αναφορές για αυξημένη μολυσματικότητα ανασυνδυασμένων εντεροϊών. Για παράδειγμα στην Ελβετία όλα τα μέλη μιας οικογένειας προσβλήθηκαν ταχύτατα από μηνιγγίτιδα. Ο αιτιολογικός παράγοντας απομονώθηκε και βρέθηκε ότι επρόκειτο για έναν Coxsackie ιό A9, ο οποίος έφερε ανασυνδυασμένες αλληλουχίες και συγκεκριμένα την 5' αμετάφραστη περιοχή από τον Echovirus 11, και την αρχή της VP4 γενωμικής περιοχής από τον εντεροϊό E-75 (Butsch et al 2013). Κατά πόσον τα φαινόμενα ανασυνδυασμού που παρατηρήθηκαν στο συγκεκριμένο στέλεχος προκάλεσαν την αύξηση στην μολυσματικότητα μένει να μελετηθεί παραπάνω.

Δεδομένου ότι η 5' αμετάφραστη περιοχή παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταγραφή του ιικού RNA και την μετάφραση των ιικών πρωτεϊνών, αλλά και στην αλληλεπίδραση με τις ιικές πρωτεΐνες αλλά και με παράγοντες του ξενιστή (όπως είναι πρωτεΐνη που συνδέεται σε περιοχές πλούσιες σε πυριμιδίνες και η πρωτεΐνη που συνδέεται σε περιοχές πλούσιες σε υπολείμματα κυτοσίνης), μία ανασυνδυασμένη 5' UTR οφείλει να είναι συμβατή με το υπόλοιπο γονιδίωμα. Αυτό είναι λογικό γιατί μία τέτοια ασυμβατότητα θα είχε αρνητικές συνέπειες στον κύκλο

ζωής του ιού. Στην μελέτη μας, τόσο το στέλεχος Gior, όσο και όλα τα υπόλοιπα στελέχη που είναι ανασυνδυασμένα στην 5'UTR, είναι επίσης ανασυνδυασμένα στην 3' περιοχή του γονιδιώματός τους. Αυτές οι παρατηρήσεις μπορούν να οδηγήσουν στις εξής υποθέσεις:

1) Τα ανασυνδυασμένα στελέχη στην 5'UTR τα οποία είναι ασύμβατα στην 3' περιοχή του γονιδιώματος εξαφανίζονται μέσω της φυσικής επιλογής.

2) Ο ανασυνδυασμός στην 5'UTR με κάποιο μηχανισμό επάγει τον ανασυνδυασμό στην 3' περιοχή του γονιδιώματος.

Συμπερασματικά: Η 5'αμετάφραστη περιοχή του γονιδιώματος των εντεροϊών διαθέτει όλα τα προαπαιτούμενα για φαινόμενα ανασυνδυασμού. Για παράδειγμα αποτελείται από συντηρημένες αλληλουχίες και δευτεροταγείς δομές. Με την παρούσα μελέτη επιβεβαιώνουμε ότι ο ανασυνδυασμός δεν είναι τόσο σπάνιο φαινόμενο στην 5'αμετάφραστη περιοχή, αλλά η ανίχνευση του φαινομένου αυτού είναι δύσκολη, γεγονός που οφείλεται στον περιορισμένο αριθμό των αλληλουχιών των κυκλοφορούντων στελεχών των εντεροϊών που έχουν αλληλουχηθεί και στο ότι η συγκεκριμένη περιοχή είναι εξελικτικά συντηρημένη. Βέβαια όσο περισσότερα κυκλοφορόντα στελέχη εντεροϊών αλληλουχούνται, τόσο περισσότερο θα μπορέσουμε να διερευνήσουμε τους εξελικτικούς μηχανισμούς τους και με τον τρόπο αυτό θα είμαστε σε θέση να καταπολεμήσουμε τα στοιχεία εκείνα που προσδίδουν στους ιούς αυτούς πλεονεκτήματα φυσικής επιλογής και προσαρμογής.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adu F., Iber J., Bukbuk D., Gumede N., Yang SJ., Jorba J., Campagnoli R., Sule WF., Yang CF., Burns C., Pallansch M., Harry T., Kew O. (2007)** Isolation of recombinant type 2 vaccine derived poliovirus (VDPV) from a Nigerian child. *Virus Res* 127:17-25
- Back S.H., Kim Y. K., Kim W. J., Cho s., Rang Oh H., Kim J. E., and Jang S. K. (2002)** Translation of polioviral mRNA is inhibited by cleavage of polypyrimidine Tract-Binding Proteins Executed by polioviral 3Cpro. *Microbiol. Immunol.* 223:31-52
- Bailly JM, Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., Chambon M., Charbonne F., Traore O., Peigue-Lafeuille H. (2009)** Phylogeography of circulating populations of echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. *Infect. Genet. Evol.* 9:699-708
- Bailly JL., Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., Chambon M., Regagnon C., Charbonne F., Peigue-Lafeuille H. (2011)** Repeated genomic transfers from echovirus 30 to echovirus 6 lineages indicate co-divergence between co-circulating populations of the two human enterovirus serotypes. *Infect Genet Evol* 11:276-289
- Barco A., Carrasco L. (1995)** A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14:3349-3364
- Belov G.A., Bonnet N. A., kovtunovych G., Jackson C. L., Lippincott-Schwartz J., Ehrenfeld E. (2007)** Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA. *J.Virol.* 81(2):558-567
- Bessaud M., Joffret ML., Holmblat B., Razafindratsimandres R., Delpeyroux F) (2011)** Genetic relationship between cocirculating human enteroviruses species C., *PLos One* 6:e24823
- Bollonaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Margaritis L., and katsorchis T.(2006)** Evolution of 2B and 2C genomic parts of species B coxsackie viruses. Phylogenetic study and comparison with other regions. *Virus Genes* 32:249-59
- Bollonaki E. Kottaridi C., Markoulatos P., Kyriakopoulou Z., Margaritis L., Katsorchis T. (2007)** Partial 3D sequences of Coxsackie viruses reveal interspecies exchanges. *Virus Genes* 35: 129-40
- Bousslama L.Nasri D., Chollet L., Belquith K., Bourlet T., Aouni M., Pozzetto B., Pillet S. (2007)** Natural recombination event within the capsid genomic region leading to a chimeric strain of human enterovirus B. *Journal of virology* 81:8944-8952
- Brown B., Oberste M., Maher K., Pallansch M.A.(2003)** Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J.Virol* 77:8973-8984

Butsch R., Tapparel C., Keller P., Herzog K., Krause M., Wunderli W., Kaiser L., Bossart W.(2013) Family outbreak of an infection with a recombinant Coxsackie A viruses in eastern Switzerland. *Infection* 41:231-235

Caro V., Guillot S., Delpeyroux F., and Crainic R.(2001) Molecular strategy for serotyping of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.*82(1):79-91

Combela N. Holmblat B., Joffret ML., Colbere-Garapin F., Delpeyroux F.(2001) Recombination between poliovirus and Coxsackie A viruses of species C: a model of viral genetic plasticity and emergence.

Clark M. E. and Dasgupta A. (1990) A transcriptionally active form of TFIIIC in modified in poliovirus-infected HeLa cells. *Mol. Cell. Biol.* 24:6861-70

Coconati A., W. Xiang, F.Lahser, T. Pfister, and E. Wimmer (1998). A protein Linkage Map of the P2 non structural proteins of poliovirus. *J. virol.*72: 1297-1307

Dedepsidis E., Pliaka V., Kyriakopoulou Z., Brakoulis C., Levidiotou-Stefanou S., Pratti A., Mamuris Z., Markoulatos P. (2008) Complete genomic characterization of an intertypic Sabin 3/Sabin 2 capsid recombinant. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52:343-351

Domingo E., Martinez-Salas E., Sobrino F., de la Jorre J.C., Portela A., Ortin J., Lopez Galindez C., Perez-Brena P., Villanueva N., Najera R., (1985) The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance-a review. *Gene* 40:1-8

Gammack N.J., Phillips A., Dunn G., Patel V., Minor P.D. (1989) Intertypic genomic rearrangement of poliovirus strains in vaccines. *Virology*: 167: 505-514

Georgopoulou A., Markoulatos P. (2001) Sabin type 2 poliovirus with intertypic vaccine/vaccine recombinant genomes. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*20:792-799

Gulevich A.Y., Yusupova R.A., Drygin Y.F. (2001) A phosphodiesterase from ascites carcinoma krebs II cells specifically cleaves the bond between VP1 and RNA of encephalomyocarditis virus. *Biochemistry* 66:345-9

Gmyl A.P., Belousov E. V., Maslova S.V., Khitrina E.V., Chetverin A.B., and Agol A. I. (1999) Non replivative RNA recombination in poliovirus. *J.Virol.* 73(11):8958-8965

Hellen C.U., Facke M., Krausslich H.G., Lee C. K., Wimmer E. (1991) Characterization of poliovirus 2A proteinase by mutational analysis: residues required for autocatalytic activity are essential for induction of cleavage of eukaryotic initiation factor 4F polypeptide *J.Virol.* 65(8): 4226-4231

Harrison's Principles of Internal Medicine ,18th edition, Vol:1, copyright: McGraw Hill

Huges P.J., North C., Minor P.D., and Stanway G. (1998) The complete nucleotide sequence of coxsackievirus A21. J.Gen.Virol. 70: 2943-52

International Committee on Taxonomy of viruses, 10th edition

Kamer G. and Argos P. (1984) Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. Nucleic Acids Res. 12:7269-7282

Kauder S.E and Racaniello V.R. (2004) Poliovirus tropism and attenuation are

Kessler H.H., Santner B., Rabenau H., et al.(1997) Rapid diagnosis of enterovirus infection by a new one step reverse transcription-PCR assay. J. Clin. Microbiol. 1997;976-977

Knipe D.M. and Howley P.M.(2007) Fields Virology, 5th edition, Vol:1, copyright: Lippincott Williams and Wilkins

Kirkegaard K. and Baltimore D.(1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. Cell 47:433-443

Kottaridi C, Bolanaki E., Siafakas N., Markoulatos P. (2005) Evaluation of seroneutralization and molecular diagnostic methods for echovirus identification. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 53:113-119

Kottaridi C., Bolanaki E., Mamuris Z., Stathopoulos C., Markoulatos P.(2006) Molecular phylogeny of VP1, 2A and 2B genes of echovirus isolates: epidemiological linkage and observations on genetic variation. Arch Virol 151:1117-1132

Kyriakopoulou Z., Kottaridi C., Dedepsidis E., Bolonaki E., Levidiotou-Stefanou S., Markoulatos P.(2006) Molecular characterization of wild type poliovirus isolated in Greece during the 1996 outbreak in Albania. Journal of clinical microbiology 44:1150-1152

Kyriakopoulou Z., Dedepsidis E., Pliaka V., Mastorakos P., Stamati A., Pratti A., Levidiotou-Stefanou S., Markoulatos P. (2010). Full-genome sequence analysis of a multirecombinant echovirus 3 strain isolated from sewage in Greece. Journal of clinical microbiology. 48:1513-1519

Kyriakopoulou Z., Tsolis K., Pliaka V., Tsakogiannis D., Ruether IG., Gartzonika C., Levidiotou-Stefanou S., Markoulatos P. (2013) Combined 5'UTR RLFP analysis and VP1 sequencing for epidemic investigation of enteroviruses. Arch. Virol. 158:103-111

Lugo D. and Krogstad P.(2016) Enteroviruses in the Early 21st century. Curr Opin Pediat. 2016 February; 28(1):107-113

Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Korolova G.A., Hinkkanen A.E, Ilonen J. (2003) Recombination in circulating enteroviruses. J. Virol. 77:10423-31.

Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Koroleva G.A., Ilonen J., and Hinkkanen A. E. (2004) Recombination in uveitis-causing enterovirus strains. J.Gen.Vir. 85:463-70

Lukashev A.N. (2005) Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Rev. Med. Virol.* 15:157-167

Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Koroleva G.A., Hinkkanen A. E. and Ilonen J. (2005) Recombination in circulating Human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J. Gen. Virol.* 86:3281-90

Marcotte L. L., Wass A. B., Gohara D. W., Pathak H. B., Arnold J. J., Filman D. J., Cameron C. E., and Hogle J. M. (2007) Crystal Structure of poliovirus 3CD protein: Virally Encoded Protease and Precursor to the RNA-dependent RNA Polymerase. *J. Virol.* 81:3583-3596

Melchers W. J., Zoll J., Tessari M., Bakhmutov D. V., Gmyl A.P., Agol V. I., and Heus H. A. (2006) A GCUA tetranucleotide loop found in the poliovirus oril by in vivo SELEX (un)expectedly forms a YNMG-like structure: Extending the YNMG family with GYYA. *RNA* 12(9):1671-1682

Molla A., Harris K. S., Paul A. V., Shin S. H., Mugavero J., and Wimmer E. (1994) Stimulation of poliovirus proteinase 3Cpro-related proteolysis by the genome-linked protein VPg and its precursor 3AB. *J. Biol. Chem.* 269:27015-27020

Mirand A., Henquel C., Peigue-Lafeuille H., Bailly J.L. (2007) Emergence of recent echovirus 30 lineages is marked by serial genetic recombination events. *J Gen Virol.* 88:166-176

Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M.N., Poyry J., Weissbrich B., Kandolf R., Cleator G.M., and Van Loon A.M. (1998) Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(1):202-227

Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D.R., Flemister M.R., Brown B.A., and Pallansch M.A. (1999) Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* 37(5):1288-93

Oberste M.S., Maher K. and Pallansch M.A. (2004) Evidence for frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty seven serotypes. *J. Virol.* 78: 855-67.

Oberste M.S., Maher K., Flemister M.R., Marchetti G., Kilpatrick D.R., Pallansch M.A (2000) Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 2000 Mar;38(3):1170-4

Oberste M.S., Michele S.M., Maher K., Schnurr D., Cisterna D., Jnttila N., Uddin M., Chomel J.J., Lau C.S., Ridha W., Al-Busaidy S., Norder H., Magnus L.O., and Pallansch M.A. (2004) Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J. Gen. Virol.* 85:3205-3212

Oberste M.S., Penaranda S., and Pallansh M.A.(2004) RNA recombination plays a major role in genomic changes during circulation of coxsackie B viruses. *J. Virol.* 78:2948-55

Oberste M.S., Maher K., Schnurr D., Flemister R.M., Lovchik C.J., Peters H., Sessions W., Kirk C., Chatterjee N., Fuller S., Hanauer J.M. and Pallansch A.M. (2004). Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses. *J. Gen. Virol.* 85:2577-2584

Olive D.M., Al-Mufti S., Al-Mulla W., et al.(1990). Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. *J. Gen. Virol.* 1990;71:2141-2147

Paul A. V., Mugavero J., Molla A., and Wimmer E. (1998) Internal ribosomal entry site scanning of the poliovirus polyprotein: implication for proteolytic processing. *Virology* 250:241-253

Paximadi E., Karakasiliotis I., Bolanaki E., Krikelis A., and Markoulatos P.(2007) Vaccine derived bi- and multi-recombinant Sabin strains. *Virus Genes* 35:541-548

Paximadi E., Karakasiliotis I., Mamuris Z., Stathopoulos C., and Markoulatos P.(2006) Genomic analysis of recombinant sabin clinical isolates. *Virus Genes* 32:203-210

Pelletier J. and Sonenberg N. (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334(6180):320-5

Psifister T., and Wimmer E. (1999) Characterization of nucleotide triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem* 274(11): 6992-7001

Pfister T., Mirzayan C. and Wimmer E. (1999) Molecular Biology. In "Encyclopedia of Virology", second edition (A. Grannof & R.G. Webster, Eds), pp 1330-1348 Academic Press Ltd.

Richards O. C., and Ehrenfeld E. (1998) Effects of poliovirus 3AB protein on 3D polymerase-catalyzed reaction. *J. Biol. Chem* 273: 12832-12840

Romanova L. I., Blinov V.M., Tolskaya E. A., Viktorova E. G. kolesnikova M. S., guseva E. A., and Agol V. I. (1986) The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants. *Arch. Pathol. Ab.Med.* 123:1161-9

Rossman M.G. (1994) Viral cell recognition and entry. *Protein Sci.* 3:1712-1725

Santti j., Harvala H., Kinnunen L., and Hyypiä T. (2000) Molecular Epidemiology and evolution of coxsackievirus A9. *J. Gen. Vir.* 81:1361-72

Santti J., Hyypiä T., Kinnunen L., and Salminen M. (1999) evidence of recombination among enteroviruses. *J. Virol.* 73:8741-9

Siafakas N., Georgopoulou A., Markoulatos P., and Spyrou N. (2000) Isolation of polioviruses and other enteroviruses in South Greece between 1994 and 1998.

Siafakas N., Markoulatos P., and Levidiotou-Stefanou S. (2004) Molecular identification of enteroviruses responsible for an outbreak of aseptic meningitis; implications in clinical practice and epidemiology. *Mol. Cell. Probes.* 18:389-98

Stanway G. (1990) Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen Virol.* 71:2483-2501

Stanway G., Hughes P. J., Mountford R. C., Minor P.D. and Almond J.W. (1984) The complete nucleotide sequence of a common cold virus; human rhinovirus 14. *Nucleic Acids Res.* 12:7859-7875.

Zhang T, Du J, Xue Y, Su H., Yang F., Jin Q.(2013) Epidemics and Frequent Recombination within Species in Outbreaks of Human Enterovirus B-associated hand, foot and mouth disease in Shandong China in 2010 and 2011. *PLoS One* 8:e67157

Zhou F., Wang Q., Sintchenko V., Gilbert G.L., O'Sullivan M.V., Iredell J.R., Dwyer D.E. (2014) Use of the 5'untranslated region and VP1 region to examine the molecular diversity in enterovirus B species. *J. Med. Microbiol.* 63:1339-1355